

DAS MODELL DER EXPERIMENTELLEN
EXTRAKORPORAL INDUZIERTEN
GANZKÖRPERHYPERTHERMIE
AM TUMORTRAGENDEN KANINCHEN
- Morphologische Untersuchungen -

Michael Hilling

Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0012

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Blümel)
Arbeit angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt

vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. J. von Sandersleben
Vorstand des Instituts für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und
Pathologische Anatomie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

DAS MODELL DER EXPERIMENTELLEN EXTRAKORPORAL INDUZIERTEN
GANZKÖRPERHYPERTHERMIE AM TUMORTRAGENDEN KANINCHEN

- Morphologische Untersuchungen -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michael Hilling
aus Papenburg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1.1	Meine Eltern	1
1.2	Meine Eltern	2
1.3	Meine Eltern	3
1.4	Meine Eltern	4
1.5	Meine Eltern	5
1.6	Meine Eltern	6
1.7	Meine Eltern	7
1.8	Meine Eltern	8
1.9	Meine Eltern	9
1.10	Meine Eltern	10
1.11	Meine Eltern	11
1.12	Meine Eltern	12
1.13	Meine Eltern	13
1.14	Meine Eltern	14
1.15	Meine Eltern	15
1.16	Meine Eltern	16
1.17	Meine Eltern	17
1.18	Meine Eltern	18
1.19	Meine Eltern	19
1.20	Meine Eltern	20
1.21	Meine Eltern	21
1.22	Meine Eltern	22
1.23	Meine Eltern	23
1.24	Meine Eltern	24
1.25	Meine Eltern	25
1.26	Meine Eltern	26
1.27	Meine Eltern	27
1.28	Meine Eltern	28
1.29	Meine Eltern	29
1.30	Meine Eltern	30
1.31	Meine Eltern	31
1.32	Meine Eltern	32
1.33	Meine Eltern	33
1.34	Meine Eltern	34
1.35	Meine Eltern	35
1.36	Meine Eltern	36
1.37	Meine Eltern	37
1.38	Meine Eltern	38
1.39	Meine Eltern	39
1.40	Meine Eltern	40
1.41	Meine Eltern	41
1.42	Meine Eltern	42
1.43	Meine Eltern	43
1.44	Meine Eltern	44
1.45	Meine Eltern	45
1.46	Meine Eltern	46
1.47	Meine Eltern	47
1.48	Meine Eltern	48
1.49	Meine Eltern	49
1.50	Meine Eltern	50
1.51	Meine Eltern	51
1.52	Meine Eltern	52
1.53	Meine Eltern	53
1.54	Meine Eltern	54
1.55	Meine Eltern	55
1.56	Meine Eltern	56
1.57	Meine Eltern	57
1.58	Meine Eltern	58
1.59	Meine Eltern	59
1.60	Meine Eltern	60
1.61	Meine Eltern	61
1.62	Meine Eltern	62
1.63	Meine Eltern	63
1.64	Meine Eltern	64
1.65	Meine Eltern	65
1.66	Meine Eltern	66
1.67	Meine Eltern	67
1.68	Meine Eltern	68
1.69	Meine Eltern	69
1.70	Meine Eltern	70
1.71	Meine Eltern	71
1.72	Meine Eltern	72
1.73	Meine Eltern	73
1.74	Meine Eltern	74
1.75	Meine Eltern	75
1.76	Meine Eltern	76
1.77	Meine Eltern	77
1.78	Meine Eltern	78
1.79	Meine Eltern	79
1.80	Meine Eltern	80
1.81	Meine Eltern	81
1.82	Meine Eltern	82
1.83	Meine Eltern	83
1.84	Meine Eltern	84
1.85	Meine Eltern	85
1.86	Meine Eltern	86
1.87	Meine Eltern	87
1.88	Meine Eltern	88
1.89	Meine Eltern	89
1.90	Meine Eltern	90
1.91	Meine Eltern	91
1.92	Meine Eltern	92
1.93	Meine Eltern	93
1.94	Meine Eltern	94
1.95	Meine Eltern	95
1.96	Meine Eltern	96
1.97	Meine Eltern	97
1.98	Meine Eltern	98
1.99	Meine Eltern	99
1.100	Meine Eltern	100

1.	EINLEITUNG	6
2.	SCHRIFTTUM	8
2.1.	Definition	8
2.2.	Theoretische Grundlagen zum Wirkungsmechanismus der Hyperthermie	9
2.3.1.	Ganzkörperhyperthermie	12
2.3.2.	Lokale Hyperthermie	13
2.3.3.	Tierexperimentelle Untersuchungen zur Hyperthermie	15
2.3.4.	Untersuchungen an Zellkulturen	17
2.4.	VX ₂ -Experimentaltumor	18
2.4.1.	Charakterisierung des VX ₂ -Experimentaltumors	18
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1.	Zielsetzung des Gesamtprojektes	21
3.2.	Material und Methodik	22
3.2.1.	Versuchstiere	22
3.2.2.	Versuchstiergruppen	22
3.2.3.	Tumormaterial	23
3.2.4.	Vorversuche	24
3.2.5.	Hauptversuche	25
3.2.5.1.	Versuchsdurchführung	25
3.2.5.2.	Anästhesie	27
3.2.5.3.	Tumorentnahme	27
3.2.5.4.	Tumorenokulation	28
3.2.5.5.	Chirurgische Technik zum Anschluß des extra- korporalen Kreislaufs	29
3.2.5.6.	Technik des extrakorporalen Kreislaufs	30
3.2.5.7.	Temperaturmessung und Monitoring	31
3.2.5.8.	Durchführung der Hyperthermie	31
3.2.5.9.	Medikamentöse Versorgung während der Perfusion	32
3.2.5.10.	Methodik der Tumor-und Organentnahme für die histolo- gische Untersuchung	33

3.2.5.11.	Histologische Technik	34
3.2.5.12.	Technik der planimetrischen Auswertung	35
3.2.5.13.	Statistische Auswertung	37
3.3.	Ergebnisse	38
3.3.1.	Makroskopischer Befund der Tumoren	38
3.3.1.1.	Spontanverlaufsgruppe	38
3.3.1.2.	Extrakorporaler Kreislauf bei Normaltemperatur über 180 Minuten	38
3.3.1.3.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42°C über 180 Minuten	39
3.3.1.4.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 60 Minuten	39
3.3.1.5.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 120 Minuten	39
3.3.1.6.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	41
3.3.1.7.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43°C über 60 Minuten	42
3.3.2.	Makroskopischer Befund der Organe	42
3.3.2.1.	Spontanverlauf	43
3.3.2.2.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	43
3.3.2.3.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43°C über 60 Minuten	44
3.3.3.	Mikroskopischer Befund der Tumoren	45
3.3.3.1.	Spontanverlauf	45
3.3.3.2.	Extrakorporaler Kreislauf bei Normaltemperatur über 180 Minuten	46
3.3.3.3.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42°C über 180 Minuten	46
3.3.3.4.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 60 Minuten	46
3.3.3.5.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 120 Minuten	47
3.3.3.6.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	48
3.3.3.7.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43°C über 60 Minuten	49

3.3.4.	Mikroskopische Befunde der Organe	50
3.3.4.1.	Spontanverlauf	50
3.3.4.2.	Mikroskopische Veränderungen der Organschnitte nach Extrakorporalem Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	50
3.3.5.	Planimetrische Auswertung von Tumorschnitten	52
3.3.5.1.	Planimetrische Auswertung von Tumorschnitten des Spontanverlaufs	52
3.3.5.2.	Planimetrische Auswertung von Tumorschnitten bei extrakorporalem Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	55
3.3.5.3.	Vergleich der planimetrischen Auswertungen des Spontanverlaufs und des extrakorporalem Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	58
3.3.6.	Tumolvolumen	60
4.	DISKUSSION	62
4.1.	Versuchsanordnung	62
4.2.	Spontanverlauf	64
4.3.	Extrakorporaler Kreislauf bei Normaltemperatur	65
4.4.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42°C über 180 Minuten und extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 60 Minuten	66
4.5.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 120 Minuten	67
4.6.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten	68
4.7.	Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43°C über 60 Minuten	69
4.8.	Planimetrische Ergebnisse	72

4.9.	Abschließende Betrachtung der Ergebnisse	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	75
6.	SUMMARY	77
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
8.	LITERATURVERZEICHNIS	79
9.	LEBENS LAUF	88
10.	DANKSAGUNG	89

1. EINLEITUNG

Die Diskussion um die Frage, ob das viele Krankheiten begleitende Fieber die Abwehr des Organismus gegen schädliche Einflüsse verschiedener Art unterstützt, bzw. diese schädlichen Einflüsse direkt bekämpft, ist sehr alt. Für die These, daß das Fieber die Krankheitsabwehr begünstigt, spricht vor allem die klinische Empirie.

Schon den Ärzten des Altertums war bekannt, daß manche Krankheiten durch eine fieberhafte Sekundärerkrankung günstig beeinflusst werden konnten (7,9,12).

Klinische Befürworter einer Hyperthermietherapie bei malignen Tumoren weisen darauf hin, daß auffallend viele Spontanremissionen von Geschwülsten in einem zeitlichen Zusammenhang mit akuten hochfieberhaften Erkrankungen stehen (9,10,14,23,68,86).

Die zytostatische Wirkung hoher Körpertemperaturen ist bekannt (37,41,49). Je schneller eine Zellpopulation in Proliferation begriffen ist, um so deutlicher kann sie durch die Hyperthermie beeinträchtigt werden. Da maligne Tumoren eine extrem hohe Proliferationsrate aufweisen, nehmen ab der Mitte der siebziger Jahre verschiedene Arbeitsgruppen die Untersuchungen über die Auswirkungen von hyperthermen Behandlungsmethoden auf bösartige Geschwulste wieder auf (3,13,18,34,57,65,66).

Jeder maligne Tumor neigt, wenn er ein gewisses Anfangsstadium überschritten hat, durch hämatogene oder lymphogene Metastasierung zur miliaren Cancerose des Organismus. In diesem Fall muß eine Tumorbehandlung konsequenterweise den ganzen Körper erfassen. Ein sinnvolles und erfolgversprechendes Verfahren, die Ganzkörperhyperthermie effektiv zu gestalten, ist es, die tumorschädigende Wärme durch extrakorporales Aufheizen des Bluts direkt an den Wirkort zu bringen.



Der extrakorporale Kreislauf bringt den Vorteil der genauen und schonenden Temperatursteuerung, was bei den anderen praktizierten Methoden wie Wasserbäder (3,29,43,79), Heißwassermatten (3), heiße Umschläge (30,64), Heißluftkammern (91), heißes Wachs (35), Kurzwellen (39,61), Mikrowellen (52,59) und Ultraschall (50,74) praktisch nur schwer möglich ist.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, ein experimentelles Modell zu erstellen, mit dessen Hilfe das Verhalten des tumortragenden Organismus vor, während und nach hyperthermer Behandlung kontinuierlich überprüfbar ist.

2. SCHRIFTTUM

Die ersten Berichte über die Anwendung von Wärme zur Behandlung von Tumoren kommen aus dem Altertum, wo die Ärzte mittels Glüh-eisen äußerlich sichtbare Geschwülste zerstörten.

400 v. Chr. schrieb Hippokrates: "Krankheiten, die die Medizin nicht heilt, müssen mit dem Messer behandelt werden. Diese, die das Messer nicht heilt, sind mit dem Feuer zu behandeln und diese, die das Feuer nicht heilt, müssen als unheilbar angesehen werden."

Im Mittelalter versuchte man es ebenfalls mit glühenden Eisen, aber auch mit Heißwasserbädern und mit Hilfe von lokalen Fremdkörpern wie Roghaaren erzeugte man künstlich fibrile Temperaturen.

2.1. DEFINITION

Hyperthermie bedeutet die Erhöhung der Körpertemperatur über die physiologischen Grenzen hinaus (67). Diese Grenzen sind je nachdem, um welche Spezies es sich handelt, sehr unterschiedlich; das Kamel z.B. weist (bezüglich seiner Normaltemperatur) eine physiologische Schwankungsbreite von 5°C auf (53). Ebenso ist die Thermotoleranz verschiedener Tumore unterschiedlich (65). Daher sind Angaben über die Wirkung der Hyperthermie von der jeweiligen Spezies und Tumorart, bei der sie induziert wurde, abhängig.

Bei einer Erhöhung der Körpertemperatur um 2°C über die Normaltemperatur spricht man von einer moderaten, bei einer darüberliegenden Temperaturerhöhung von einer extremen Hyperthermie.

Je nach zugrundeliegender Ursache gibt es klinisch verschiedene Formen der Hyperthermie, wie Fieber, Hitzestau, die maligne Hyperthermie, die pharmakologisch-induzierte Überwärmung sowie die mechanische durch Wärmezufuhr von außen induzierte Hyperthermie, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

2.2. Theoretische Grundlagen zum Wirkungsmechanismus der Hyperthermie

Die Voraussetzung für die Anwendung der Hyperthermie als therapeutische Maßnahme zur Krebsbekämpfung ist die größere Hitzesensitivität von Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe (6,13,15).

Sowohl Normalgewebe, wie auch Tumorgewebe werden durch hohe eiweißkoagulierende Temperaturen zerstört. Es gibt jedoch einen therapeutisch nutzbaren Temperaturbereich, der unter dieser eiweißdenaturierenden Temperatur von ca. 44°C - 45°C liegt, und die wärmeempfindlicheren Tumorzellen angreift, ohne das umliegende gesunde Gewebe zu schädigen (6,13,18).

Crile (15) stellt fest, daß sich sofort nach einer Hyperthermiebehandlung weitertransplantierte Zellen im neuen Empfänger etablieren, während dies bereits vier Stunden danach nicht mehr der Fall ist. Palzer und Heidelberger (63) stellen die These auf, daß die Wirkung der Hyperthermie ein zweiphasiges Geschehen ist; eine potentielle Schädigung wird erst nach einiger Zeit zu einer effektiven. Daraus folgt, daß neoplastische Zellen nicht durch die Hyperthermie allein zerstört werden, sondern daß das diese Zellen umgebende Milieu ein wesentlicher mitbestimmender Faktor ist. Dies folgert auch von Ardenne (4,5). Er erreicht eine Milieuveränderung im Tumorgewebe durch Übersäuerung, die er sogar für notwendig für eine erfolgreich angewandte Hyperthermie hält.

Die erhöhte Thermosensitivität von Tumoren gegenüber Normalgewebe wird wahrscheinlich von drei Punkten bestimmt:

1. der Mikrozirkulation im Tumor
2. dem interstitiellen pH im Tumor
3. von der O_2 -Spannung im Tumor
4. der höheren Mitoserate von Tumorzellen

Das Gefäßnetz von Neoplasmen unterscheidet sich von dem normalen Gewebes: Bedingt durch das schnelle Wachstum von malignen Neoplasmen bleibt die Tumolvaskularisation hinter der Geschwindigkeit des sich ausbreitenden Tumorgewebes zurück. Es entstehen hypoxische, im weiteren Verlauf nekrotische Bezirke (24). Die Gefäßversorgung "hinkt praktisch hinterher". Es entstehen dünnwandige kleinkalibrige Gefäße, denen z.T. das stützende Bindegewebe und die glatte Muskulatur fehlt. Im präkapillären Bereich ist eine Unterscheidung zwischen Vene und Arterie teilweise nicht mehr möglich. Da Tumoren durch eine autonome, enthemmte Überschussproduktion von körpereigenem Gewebe definiert sind, und dies in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägten Verlusten spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist, sind auch die für gesundes Gewebe charakteristische gefäßarchitektonische Ordnung und ihre neurovegetativen Regulationsmechanismen gestört (67).

Bei einer Erhöhung der Temperatur kommt es ebenso wie im gesunden Gewebe zunächst zu einem Anstieg der Durchblutung. Ab dem sog. "Breaking Point" geht die Durchblutung von Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe stark zurück (25). Bicher (8) nimmt die O_2 -Spannung als Maß für die Durchblutung und weist nach, daß sie bis $41^{\circ}C$ ansteigt, in den darüberliegenden Temperaturen jedoch abfällt. Die durch Hyperthermie bedingte Verminderung der Tumordurchblutung führt zu einer Zunahme der anaeroben Glykolyse in Folge von unzureichendem O_2 -Angebot (3). Dies führt zum Anstieg von Stoffwechselabbauprodukten, insbesondere von Laktat, was zu einer Übersäuerung des Gewebes führt.

Dickson (18) zeigt am Yoshida-Sarkom der Ratte, daß Hyperthermie von 45°C über 180 Minuten zu einer Erniedrigung des pH im Tumorgewebe um 0,2 führt. Diese pH-Erniedrigung bedingt nach von Ardenne (3,4) eine Versteifung der Erythrozytenmembran. Dies führt wiederum zu einer Erhöhung der Blutviskosität, was terminal zur Stase und Thrombose führt und die Durchblutung völlig zum Erliegen bringen kann.

Bezogen auf die therapeutische Anwendung von Wärmebehandlungen zur Tumorbekämpfung stellen eine Reihe von Untersuchern fest, daß ein synergistisch additiver Effekt besteht, wenn hypertherme Vorschädigung mit einer Strahlenbehandlung (34,58,59) und/oder mit einer Zytostatikabehandlung (38,47,55,58,81) kombiniert wird.

Parallel zu den Untersuchungen über den Einfluß von Hyperthermie auf Tumorzellen unternehmen andere Untersucher Experimente über die Auswirkung auf Normalgewebe.

1939 führen Ham und Frost (33) pathologisch anatomische Untersuchungen an Kaninchen durch, bei denen sich nach 6-maliger Hyperthermie über drei Stunden bei 41,4°C Hämorrhagien, Glykogenverlust und eine fettige Herzmuskeldegeneration zeigt.

1944 berichten Kellaway und Rawlison (40) über einen Anstieg des Histaminspiegels bei zunehmender Temperatur an Meerschweinchen und Katzen. Fuhrman und Field (25) stellen bei Untersuchungen der O₂-Aufnahme von Gewebeproben fest, daß der Sauerstoffverbrauch vor allem der Leber bei steigenden Temperaturen abnimmt. Sie belegen anhand elektroenzephalographischer Untersuchungen, daß trotz einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs des Gehirns, keine meßbare Schädigung dieses auf eine permanente O₂-Aufnahme angewiesenen Organs eintritt. Anhand von Gehirnschnitten stellen sie bei Hyperthermien von 43°C über 1 Stunde eine Abnahme der O₂-Aufnahme von 20 % fest, ohne daß erkennbare Schädigungen eintreten.

2.3.1. GANZKÖRPERHYPERTHERMIE

Die ersten wissenschaftlich dokumentierten Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Körpertemperaturerhöhung und Tumorregression kommen 1866 von Busch (12). Er schildert den Fall eines Patienten mit einem histologisch gesicherten Gesichtssarkom, das nach zweimaliger hochfieberhafter Erysipelinfektion verschwand. 1884 bestätigt Bruns (9) diese Beobachtung bei einem seiner Patienten. Coley (14) setzt diese Beobachtung in eine Therapieform um, bei der er hohes Fieber durch die Injektion von Bakterientoxin erzeugt. Dieses von ihm entwickelte "Coley-Toxin" wird bis in die heutige Zeit verwendet. Coley zeigt damit den direkten Zusammenhang zwischen Körpertemperaturerhöhung und Geschwulstregression auf. Die Erzeugung von Hyperthermie mittels pyrogener Substanzen ist sowohl, was die Höhe der Temperatur betrifft, als auch was das Zeitintervall der Temperaturerhöhung anbelangt, nur unzureichend steuerbar und nur schwer standardisierbar. Deswegen war man bestrebt, eine passive, von außen über die Körperoberfläche einwirkende Hyperthermiebehandlung zu entwickeln.

1967 arbeiten Kirsch und Schmidt (43) nach der von Ardenne entwickelten Methode der Wärmezufuhr über Wasserbäder, um die klinische Anwendbarkeit der von Ardenne gemachten experimentellen Untersuchungen (3) zu überprüfen. Sie erreichen tatsächlich Geschwulstregressionen jedoch behindern Kreislaufkomplikationen Schwierigkeiten bei der genauen Temperatursteuerung sowie der technische Aufwand die sinnvolle klinische Anwendung.

Pettigrew et al. (65) erzeugen Hyperthermie mit erhitzten Atemgasen und hüllen die Patienten in warmes flüssiges Wachs ein. Ähnlich arbeiten Larkin et al. (48) und Bull et al. (10). Anstatt des Wachses verwenden Hermann et al. (36) heizbare Polyäthylendecken und bei einer weiteren Patientengruppe versuchen sie mittels einer Gefäßprothese in Form eines arterio-venösen Shunts zwischen A. und V. femoralis zum Anschluß eines Wärmeaustauschers hypertherme Bedingungen zu erreichen. Außerdem kombinieren sie die

Hyperthermieverfahren noch mit einer Chemotherapie. Sie erreichen bei 60 % der Patienten partielle Tumorremissionen über einen Zeitraum von durchschnittlich 9 Wochen, wobei sie die Patienten 14 - 16 mal einer Behandlung unterziehen. Nebenwirkungen wie Hypotonie, Steigerung der kapillaren Durchlässigkeit, Lungenödeme und eine disseminierte intravasale Koagulopathie führen zum Abbruch dieser Therapie.

Lange et al. (46) erreichen mittels extrakorporal induzierter Ganzkörperhyperthermie bei kolorektalen Karzinomen Stadium IV ein Wachstumsstop für durchschnittlich 10 Monate. Sie perfundieren den Körper ebenfalls über einen A.-V. femoralis Shunt mit extrakorporal erwärmten Blut. Die Dauer der hyperthermen Behandlung liegt bei 6 - 8 Stunden bei 3 - 4 Behandlungen. Zusätzlich wird die Hyperthermiebehandlung durch eine Zytostatikabehandlung mit 5-Fluorouracil ergänzt.

Von Ardenne und Mitarbeiter kombinieren eine moderate Ganzkörperhyperthermie von $40,5^{\circ}\text{C}$ mit einer extremen Lokahyperthermie der Geschwulstregion von $42-42,5^{\circ}\text{C}$ (3). Sie modifizieren das Selektionsverfahren zu einer zweistufigen fraktionierten Rasterhyperthermie ergänzt durch eine intensive Hautkühlung und eine kurzzeitige unblutige Blutdrucksenkung.

2.3.2. LOKALE HYPERTHERMIE

Wegen der mangelhaften Steuerbarkeit der durch pyrogene Substanzen oder durch von außen über die Haut hervorgerufenen Ganzkörperhyperthermien liegt es nahe, die Hitzeanwendung nur auf die tumortragenden Regionen zu beschränken.

1988 benutzt Westermarck (93) bei inoperablen Zervixkarzinomen eine hohle vaginal eingebrachte Metallspirale, durch die $42 - 44^{\circ}\text{C}$ heißes Wasser zirkuliert. Schon ein Jahr später können Gottschalk (30) und Percy (64) sein positives Ergebnis bestätigen.

Goetze (29) setzt 1930 mit Erfolg Wasserteilbäder an den Extremitäten und an Penistumoren ein. Cavalliere (13) berichtet 1967 von bemerkenswerten Tumorregressionen nach reiner Hitzeperfusion von bis zu 45°C über vier bis sechs Stunden, die allerdings schwere Nebenwirkungen zeigt. Stehlin (81) wendet die moderate Hyperthermie in Kombination mit Zytostatika an Melanomen und Weichteilsarkomen an. Er erreicht bei 83,5 % seiner Patienten eine Überlebensrate von 5 Jahren.

Aigner (1) beschreibt die Methode der isolierten Extremitätenperfusion, mit der man sowohl Hitze wie auch Zytostatika an eine tumorbefallene Extremität bringen kann. Bei der lokalen Hitzeanwendung stellt dies heute die Methode der Wahl dar.

2.3.3. TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR HYPERTHERMIE

Nachdem Bruns (9), Busch (12) und Coley (14) auf den Zusammenhang von Fieber und Krebsregression hingewiesen hatten, werden ab der Jahrhundertwende zahlreiche Untersuchungen an Tieren gemacht. 1903 erhitzt Jensen (37) Tumore der Maus auf 47°C über 5 Minuten und erreicht einen Wachstumsstillstand der behandelten Geschwulste. Loeb (49) macht im gleichen Jahr Untersuchungen an Fragmenten von Sarkomen der Ratte, die nach der Erhitzung auf 45°C über 30 Minuten nicht mehr transplantabel sind.

1907 erhitzt Ehrlich (20) Karzinosarkomstücke und überimpft sie auf Mäuse, wobei nur das Sarkom wächst, während das Karzinom nicht angeht. Haaland (32) findet bei gleichem Versuch gar kein Tumorstadium mehr. Durch die Eliminierung der Temperaturkontrolle des Gehirns mittels eines chirurgischen Eingriffs und einem dadurch bedingten Ansteigen der Körpertemperatur auf $40,8^{\circ}\text{C}$ erreicht Vi-dell 1911 (86) die Regression eines Lymphosarkoms bei einer Hündin.

Rhodenburg und Prime (69) führen 1921 ausgedehnte Versuche am Crocker-Mäusesarkom 180 durch. Sie untersuchen die histologischen Veränderungen 24-144 Stunden nach 20-minütiger Hyperthermie und finden eine zunehmende Nekrose des Tumorgewebes, während das Normalgewebe unbeeinträchtigt bleibt.

1927 erreichen Westermarck (94) und 1940 Overgaard und Okkels (60) sowie Johnson (39), die umfangreiche und genaue Untersuchungen an Flexner-Jobling Karzinomen von Ratten vornehmen, Totalregressionen dieser Geschwülste nach Hyperthermie von 44°C über 180 Minuten.

Ab Anfang der 70er Jahre nimmt von Ardenne die Forschung zur Hyperthermie in größerem Umfang wieder auf. Er integriert sie in sein Konzept der Krebs-Mehrschritt-Therapie (3), bei der die Hyperthermie neben einer durch hohe Glucosegaben hervorgerufenen Übersäuerung des Gewebes sowie einer Sauerstoffanreicherung des Blutes als einer von drei Schritten zur Tumorbekämpfung durchgeführt wird. Seine Untersuchungen ergeben einen Synergismus zwischen Hyperthermie und der Übersäuerung des Tumorgewebes bezogen auf die Hemmung der Mikrozirkulation von Tumorzellen.

Von Ardenne setzt die selektive Übersäuerung des Krebsgewebes und die Hyperthermie von 42°C gleichzeitig ein. Zur Vernichtung der noch überlebenden Tumorzellen ist in von Ardenne's Therapiekonzept als dritter Therapieschritt eine "Mehrschrittstimulation" der körpereigenen Abwehr vorgesehen. Bei dieser ist die chemische Reizung des Abwehrsystems durch Derivate des N-(2-Cyano-äthyl)-Harnstoff bzw. durch Thymusextrakte mit einer zusätzlichen Aktivierung der Abwehrzellen durch die O_2 -Mehrschritt-Therapie kombiniert. Dies wird von Overgaard (62) 1980 bestätigt.

Zu diesem Verfahren führen von Ardenne et al. großangelegte Versuche an Wistar-Ratten durch, denen Yoshida-Sarkome oder DS-Karzinomasarkome (3,4,5) implantiert waren. Den Tieren werden über 250 Minuten 40 %ige Glukose infundiert, wobei ein Blutglukosespiegel von 500 mg/100 ml erreicht wurde. Während der letzten 100 Minuten der Infusion erfolgt zusätzlich eine lokale Erwärmung der Tumorgebiete. Durch Messung der Gewebeextinktion nach Evansblue-Applikation wird die durch diese Behandlung erreichte Hemmung der Mikrozirkulation belegt.

Über einen Zeitraum von 10 Jahren untersuchen von Ardenne und Mitarbeiter die praktischen und theoretischen Möglichkeiten von hyperthermen Behandlungsverfahren; seine Erkenntnisse über die praktische Anwendbarkeit von Hyperthermieverfahren und über den Metabolismus von Krebszellen vor, während und nach Hyperthermie liefern Grundlagen sowohl für weitere Forschungen als auch für die klinische Anwendung (3,4).

1962 führen Mori et al. (55) Versuche mit der Zytostatikaperfusion bei Bluttemperaturen von 40°C über 30 - 60 Minuten an VX₂-Experimentaltumoren durch, die Mashima et al. (51) 1972 unter normothermen Bedingungen weiterführen. Ab 1970 unternehmen die Arbeitsgruppen von Muckle, Dickson und Johnston zahlreiche Versuche, den VX₂-Experimentaltumor mit Hyperthermie zu therapieren, wobei sie eine Überlebenszeit von 18 Monaten bei behandelten im Vergleich zu 10 Wochen bei unbehandelten Tieren erreichen (17,18,56,57,58,59). Sie erzeugen die Hyperthermie mit Hilfe von Wasserbädern und untersuchen die Kombination von Radiotherapie und Zytostatika mit Hyperthermie (58,59). Durch ihre Untersuchungen (57,58) können sie nachweisen, daß das VX₂-Tumor hyperthermieempfindlich ist und damit ein für Forschungen auf dem Gebiet der Hyperthermie geeignetes Modell darstellt.

2.3.4. UNTERSUCHUNGEN AN ZELLKULTUREN

Ergänzt werden die Ergebnisse am menschlichen oder tierischen Organismus durch Untersuchungen von Tumorgewebe in Zellkulturen.

1912 zeigt Lambert (44), daß Mäusersarkomzellen eine Erwärmung auf 43°C nur 3 Stunden überleben, während Bindegewebe sechs Stunden überlebt.

1941 stellt Vollmar (89) eine Wachstumshemmung bei wärmebehandelten Krebszellen fest. 1957 bestätigten dies Selawry et al. (73), Bender und Schramm (6) ermittelten einen Temperaturunterschied von 1°C in der Hitzeresistenz von Tumor- zum Normalgewebe. Dieses Phänomen wurde 1961 von Crile (15) und 1967 von Cavalliere et al. (13) weiter bestätigt.

2.4. VX₂-EXPERIMENTALTUMOR

Dieser Experimentaltumor wird aus folgenden Gründen für die eigenen Untersuchungen zur Hyperthermie gewählt: Zahlreiche Arbeiten zeigen, daß dieser Tumor leicht transplantabel ist und viele Möglichkeiten hinsichtlich des Inokulationsortes bestehen (21,51,96,97). Er ist transplantierbar in Leber, Niere, Milz, Hoden, Peritoneum, Knochenmark, Skelettmuskulatur und Subcutis. Der Tumor zeichnet sich ferner durch konstantes Wachstum und geringe Spontanregressionen aus (51,97,31).

Es gibt außerdem zahlreiche Arbeiten, die die Hitzesensibilität dieses Experimentaltumors bei der Anwendung von Radiowellen, hohen Frequenzen und Heißwasserbädern belegen (17,18,47,57,58,59). Ein signifikantes Absinken der O₂-Aufnahme nach zwei Stunden und Zelltod sechs Stunden nach Erhitzen der Tumorzellen auf 42°C bei nahezu keiner Schädigung gesunden Gewebes beschreiben Muckle und Dickson (56,57).

2.4.1. CHARAKTERISIERUNG DES VX₂-EXPERIMENTALTUMORS

Dieser Experimentaltumor des Kaninchens ist ein transplantables anaplastisches Karzinom, das sich durch spontane Entartung aus dem Shope-Virus induzierten Kaninchenpapillom (78) entwickelt und 1940 von Kidd und Ross beschrieben wird (42). Spezifische Antikörper gegen das Shope-Virus können fünf Jahre im Blut tumortragender Tiere nachgewiesen werden (42). Später ist kein Antikörpernachweis mehr möglich. Es ist jedoch unklar, ob das Virus völlig verschwunden oder nur noch in einer nicht antigenen Form in den Karzinomzellen vorhanden ist (42).

Nach Inokulation dringt der sich etablierende Tumor zunächst in das Wirtsgewebe ein, bis er nach einigen Tagen von einer reaktiven Bindegewebskapsel umgeben wird und dann expansiv verdrängend wächst. Die Wachstumsgeschwindigkeit und Form hängt einerseits vom Druck des umliegenden Gewebes auf die Tumorisel und andererseits von der Malignität der verwendeten VX₂-Tumoralinie ab (97).

Mit fortschreitendem Wachstum nimmt die Geschwulst eine kugelige Form an und ist dann von seiner Umgebung gut abzugrenzen. Das vom Aussehen her fischfleischähnliche Tumorgewebe ist von hellgrau rosaroter Farbe und derber Konsistenz. Bis zu einem Durchmesser von 1,3 - 1,5 cm ist der Tumor solide, bei weiterem Wachstum bilden sich Nekroseherde, die sowohl was ihren prozentualen Anteil am Tumorgewebe betrifft als auch aus was ihre absolute Größe betrifft, fortschreitend zunehmen (42,47).

Mikroskopisch besteht die Geschwulst aus uniformen Tumoralinseln, die in ein Netz aus retikulären Fasern, Fibroblasten und Gefäßen eingebettet sind. Dieses Stroma geht nach außen in die bindegewebige Kapsel des Karzinoms über. Um diese Bindegewebskapsel herum entsteht eine ödematisierte Zone, die mit untergegangenen Zelltrümmern sowie Abwehrzellen gefüllt ist. In Einzelfällen kann die Bindegewebsabgrenzung so massiv werden, daß das Tumorstadium zum Stillstand kommt (42).

Die Tumorzellen sind polygonal 7 - 18 μ groß. Die relativ großen uniformen Kerne enthalten reichlich randständiges Chromatin. Das Zytoplasma nimmt etwa die Hälfte des Zellvolumens ein und läßt sich gut mit Eosin und Hämatoxylin anfärben (42). Im Blickfeld bei 75facher Vergrößerung befindet sich durchschnittlich eine Mitose. Riesenzellbildungen sind selten (82).

Die sich im Verlauf des Tumorstadiums bildenden Nekroseherde konfluieren schließlich zu einer großen Zentralnekrose, die die Geschwulst im Anschnitt makroskopisch einem Abzeß ähneln läßt. Im terminalen Stadium mißt die Geschwulst 8 - 10 cm im Längsdurchmesser, ist zentral weitgehend nekrotisch und hat eine Pseudokapsel

von 2 - 6 mm Dicke, die aus Bindegewebe und vitalen Tumorzellen besteht, die die Kapsel innen auskleiden und den Tumor auch nach seinem Aufbrechen nach außen weiterwachsen lassen (42,82).

Der VX_2 -Tumor metastasiert in die regionalen Lymphknoten und die Lunge, wobei die Metastasen gut vom gesunden Gewebe abzugrenzen sind, aber nicht in dem Maße abgekapselt sind, wie der Primärtumor (42,96).

Für etwa 21 - 28 Tage nach der Implantation hat die Geschwulst ein progressives Wachstum, dann läßt die Wachstumsgeschwindigkeit nach. Bei den tumortragenden Kaninchen setzt eine langsam fortschreitende Tumorkachexie mit einer deutlichen Hyperkalzämie sowie gesteigerter Osteoklastenaktivität und Knochenmarkshyperplasie ein (95,96).

Voelkel et al. (87) sowie Seybart (75) weisen nach, daß das von VX_2 -Tumor gebildete Prostaglandin E₂ dieses bewirkt. Dies wird von Wolfe und Bitman (95) sowie von Young et al. (96) bestätigt.

Voelkel et al. (88) stellen außerdem stark erhöhte Ceruloplasmingehalte im Serum tumortragender Tiere fest, die parallel zum Tumorwachstum ansteigen, so daß dieses Metallprotein von Unger-Watson (84) als biochemischer Tumormarker vorgeschlagen wird.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. ZIELSETZUNG DES GESAMTPROJEKTS

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, können bisher zahlreiche Untersucher zeigen, daß durch Hyperthermie eine Tumorschädigung erzielt werden kann. Sie erreichen die Temperaturerhöhung mittels von außen zugeführter Wärme, die aber keine genaue Kontrolle und Steuerbarkeit der gewünschten Temperaturhöhe ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit soll ein Modell zur extrakorporal induzierten hyperthermen Ganzkörperperfusion am VX₂-Tumor tragenden Kaninchen erstellt werden, das es erlaubt, kontinuierlich morphologische Studien zum Verhalten des Organismus und des Tumors vor, während und nach hyperthermer Behandlung durchzuführen.

Am gleichen Modell werden außerdem noch die absolute Größenzunahme und Durchblutung des Tumors (2), die Veränderungen der Laborparameter (19) und die computertomographische Darstellung des Tumorverhaltens (90) mit und ohne extrakorporal induzierter Ganzkörperhyperthermie untersucht.

3.2. MATERIAL UND METHODIK

3.2.1. VERSUCHSTIERE

Für die Versuche werden $n = 191$ Bastardkaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 2,8 und 5,6 kg verwendet. Sie werden in Drahtetagenkäfigen auf Blechrosten bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % bei einer Lufttemperatur von 18 - 20°C und einem automatisch geregelten Tag-Nacht-Beleuchtungsrythmus mit einer maximalen Beleuchtungsintensität von 500 Lux gehalten. Das Futter besteht aus Kaninchenalleinfutter (Altromin K) ad libitum aus Fütterungsautomaten sowie zusätzlich Salat, Gemüse und trockenem Brot. In den Wintermonaten von Oktober bis April erhalten die Tiere noch ein Multivitaminpräparat (Streß-Vitamin Fa. Selectavet) zur besseren Konditionierung. Die Trinkwasserversorgung erfolgt mit Leitungswasser aus Nippelselbsttränken ad libitum.

3.2.2. VERSUCHSTIERGRUPPEN

Für die Vorversuche zur Entwicklung und Optimierung der Operations- und Perfusionstechnik sowie der Narkose werden 75 Tiere benötigt.

Weitere 33 Tiere werden als Spenderkaninchen für die Tumortransplantation gebraucht.

Für die Hyperthermieversuche und die Versuche zum extrakorporalen Kreislauf werden 64 Kaninchen, die wie folgt in Versuchsgruppen aufgeteilt waren, verwendet.

- 10 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie 42°C über 180 Min
- 9 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie $42,5^{\circ}\text{C}$ über 60 Min
- 10 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie $42,5^{\circ}\text{C}$ über 120 Min
- 15 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie $42,5^{\circ}\text{C}$ über 180 Min
- 5 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie 43°C über 60 Min
- 15 Kaninchen extrakorporaler Kreislauf ohne Hyperthermie über 180 Min

Parallel dazu werden 19 Kontrollkaninchen mit Spontanverläufen gehalten, also mit unbehandelten Tumoren, die außer der Tumordinokkulation keine weitere Behandlung erfuhren.

3.2.3. TUMORMATERIAL

Für die Vorversuche und die Hauptversuche wird jeweils ein frischer VX_2 -Tumor verwendet. Er stammt von einer VX_2 -Tumorzell-Linie aus dem Krebsforschungszentrum Heidelberg und ist subcutan in ein Ohr eines Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" implantiert und etwa kirschgroß.

Von diesen Ausgangstumoren wird nach der vorsichtigen Extirpation und Aufbereitung der entnommenen Geschwulst eine Zellsuspension hergestellt und diese auf Bastardkaninchen überimpft. Die weitere Passage des VX_2 -Tumors erfolgt in gleicher Art und Weise.

3.2.4. VORVERSUCHE

Die umfangreichen Vorversuche sind notwendig, um ein Anästhesieverfahren zu entwickeln, das über den angestrebten Zeitraum von 3 - 5 Stunden und den damit verbundenen Belastungen das kleinstmögliche Risiko beinhaltet.

Die chirurgische Technik sowie der technische Ablauf der Perfusion und seine Kontrolle müssen in einem zweiten Schritt entwickelt und erprobt werden.

Weiterhin ist es nötig, eine Tumorlokalisation zu finden, die die angestrebten Untersuchungen in reproduzierbarer Weise ermöglicht. Ebenso muß eine Intensivbetreuung der Versuchstiere während der Perfusionszeit erarbeitet werden, die anhand von Überwachungstechniken wie Monitoring der Kreislaufparameter, Temperaturkontrolle und -steuerung einen standardisierten Versuchsablauf gewährleistet.

Die zur Kontrolle des Therapieerfolgs angestrebten Untersuchungsmethoden müssen gefunden und auf ihre Durchführbarkeit überprüft werden.

Erst nachdem die oben genannten Parameter in reproduzierbarer und standardisierter Form festliegen, wird mit den eigentlichen Versuchen zu den Auswirkungen dieser hyperthermen Behandlungsmethode begonnen.

3.2.5. HAUPTVERSUCHE

3.2.5.1. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Der Gesamtversuch gliedert sich wie folgt:

Tag	Versuchsteil												
1	1. Tumorentnahme von einem Spenderkaninchen 2. Transplantation der vom Spenderkaninchen gewonnenen VX₂-Tumor-suspension auf ein Versuchstier												
4-15	Tumolvolumenmessungen mit der Schublehre												
15	<table> <tr> <td>Extrakorporaler Kreislauf ohne Hyperthermie normotherm:</td><td>-180 Min.</td></tr> <tr> <td>od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42⁰C :</td><td>-180 Min.</td></tr> <tr> <td>od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5⁰C:</td><td>- 60 Min.</td></tr> <tr> <td>od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5⁰C:</td><td>-120 Min.</td></tr> <tr> <td>od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5⁰C:</td><td>-180 Min.</td></tr> <tr> <td>od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43⁰C :</td><td>- 60 Min.</td></tr> </table>	Extrakorporaler Kreislauf ohne Hyperthermie normotherm:	-180 Min.	od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42 ⁰ C :	-180 Min.	od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	- 60 Min.	od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	-120 Min.	od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	-180 Min.	od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43 ⁰ C :	- 60 Min.
Extrakorporaler Kreislauf ohne Hyperthermie normotherm:	-180 Min.												
od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42 ⁰ C :	-180 Min.												
od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	- 60 Min.												
od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	-120 Min.												
od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5 ⁰ C:	-180 Min.												
od. Extrakorporaler Kreislauf mit Hyperthermie von 43 ⁰ C :	- 60 Min.												
16	1. Tumolvolumenmessung mit der Schublehre 2. Angiographische Untersuchung 3. Computertomographische Untersuchung 4. Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung 5. Pathologisch-anatomische Untersuchung der entnommenen Tumore												
18-21	1. Tumolvolumenmessung mit der Schublehre 2. Angiographische Untersuchung 3. Computertomographische Untersuchung 4. Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung 5. Pathologisch-anatomische Untersuchung der entnommenen Tumore												
21-27	Tumolvolumenmessungen mit der Schublehre												
27	1. Euthanasie 2. Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung 3. Pathologisch-anatomische Untersuchung des gesamten Tieres und der entnommenen Gewebeteile												
27-45	Tumolvolumenmessungen mit der Schublehre bei den nicht für die Gewebeentnahmen am 27. Tag euthanisierten Kontrolltieren mit Spontanverlauf												
45	1. Euthanasie der nicht für die Gewebeentnahmen am 27. Tag getöteten Tiere des Spontanverlaufs 2. Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung 3. Pathologisch-anatomische Untersuchung des gesamten Tieres und der entnommenen Gewebeteile												

Versuchsprotokoll

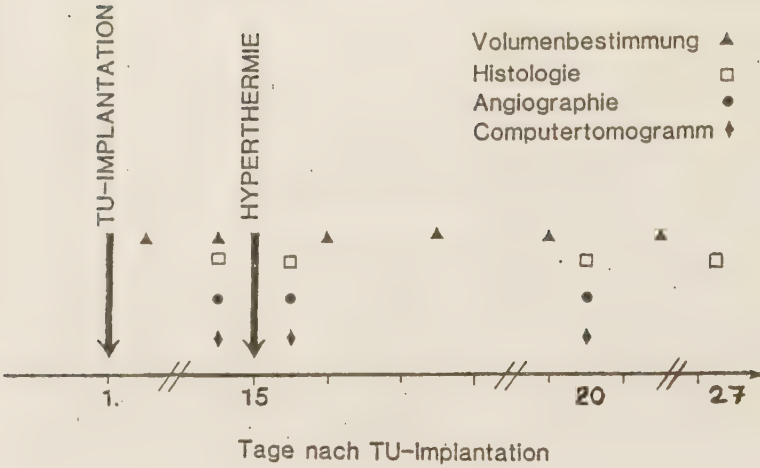


Abb. 1

Versuchsaufbau

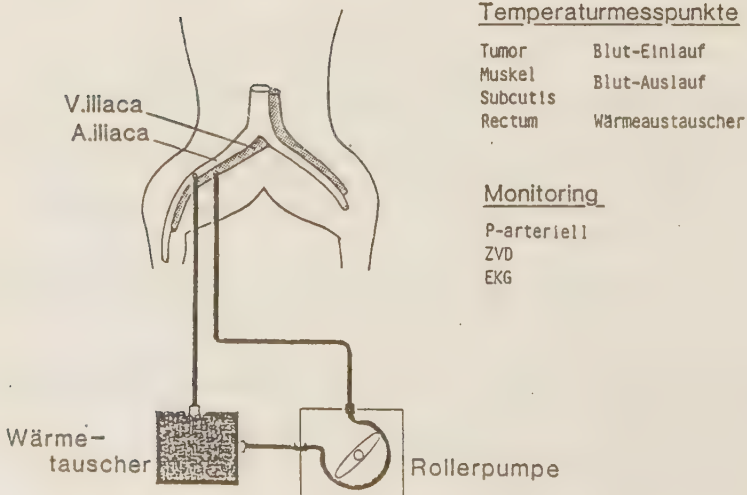


Abb. 2

3.2.5.2. ANÄSTHESIE

Für die Anästhesie zu den operativen Eingriffen wird den Versuchstieren eine Ketamin-Xylazin-Allgemeinanästhesie in einer Dosierung von 50 mg/kg KG Ketamin und 4 mg/kg KG Xylavin intramuskulär verabreicht (22). Bei Bedarf wird Ketamin mit physiologischer NaCl im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und über die Ohr randvene nachgegeben, wobei die Nachdosierung ca. 20 % der Initialdosis beträgt.

Zur Schmerzausschaltung im Wundgebiet werden entweder eine geringe Menge eines Lokalanästhetikums (Xylocain^R 2 %) subcutan unter der vorgesehenen Schnittstelle injiziert oder das Inzisionsgebiet mit einer ein Lokalanästhetikum enthaltenen Salbe eingerieben. Bei Anschluß der Tiere an den extrakorporalen Kreislauf wird die Basisnarkose mit Ketamin-Xylazin durch die alleinige Gabe von Diazepam (Valium^R-Roche) verlängert. Die Initialdosis beträgt 5 mg/kg KG i.v. über die Ohr randvene. Bei einsetzenden Abwehrbewegungen werden Nachdosierungen von 2-5 mg/kg KG verabreicht.

3.2.5.3. TUMORENTNAHME

Das den weiterpassagierten VX₂-Tumor tragende Kaninchen wird mit Ketamin und Xylazin anästhesiert, die Entnahmestelle großflächig rasiert und desinfiziert, und im Anschluß daran nach Inzision der Haut die darunterliegenden Tumoren unter sterilen Krauteln vorsichtig herausgeschält. Die Kaninchen werden nach dieser Entnahme mit Pentobarbital (Narcoren^R-Merieux) schmerzlos getötet. Diese so gewonnenen Tumoren haben ein Volumen von 8-12 cm³. Sie werden von anhaftendem Bindegewebe befreit und mechanisch mittels einer sogenannten Embryonalquetsche (Leihgabe des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg) Material-Chrom-Nickel-Stahl, Kolbenlänge 72 mm, Kolbendurchmesser 19 x 25 mm, Porengröße des Siebes 0,7 mm) zerkleinert. Hierbei werden die bereits grob mit der Schere zerkleinerten Tumorgewebsteile durch das Metallsieb gepreßt, in dem die faserigen Bindegewebsanteile hängenbleiben, so daß eine größ-

tenteils bindegewebsfreie VX₂-Tumorzellsuspension übrig bleibt. Diese wird im Verhältnis 1 : 10 mit McCoys-Wash verdünnt. Die Tumorsuspension wird aufgeschüttelt, in Einmalspritzen abgefüllt und kann jetzt auf weitere Versuchstiere überimpft werden. Diese mechanische Art der Tumorerkleinerung entspricht im wesentlichen der von Mori et al. (55) und Mashima et al. (51) beschriebenen Methode. Die von Dickson und Muckle (17) angewendete enzymatische Methode wird von uns nicht durchgeführt.

3.2.5.4. TUMORINOKULATION

Als Inokulationsort wird die Subcutis entlang der Halswirbelsäule ausgehend vom Atlantaoccipitalgelenk bis caudal des Schulterblattes gewählt.

Für die Implantation der Tumorzellsuspension ebenso wie für die Blutentnahmen an nicht narkotisierten Kaninchen werden die Tiere zur besseren Fixation in einen Zwangskäfig verbracht und Haut und Haare im Bereich der vorgesehenen Implantationsstellen desinfiziert.

Zur Injektion werden 16 G Kanülen, deren Lumen gerade groß genug ist, um die Zellsuspension mit geringem Druck injizieren zu können, verwendet: Nach manueller Kontrolle des Nadelsitzes wird die Suspension in die Subcutis injiziert. Um pro Tier jeweils 3 voneinander unabhängige Tumoren anwachsen zu lassen, wird die erste Injektion in die dorsale Nackenbeuge, die beiden anderen jeweils 5 cm davon entfernt injiziert.

3.2.5.5. CHIRURGISCHE TECHNIK ZUM ANSCHLUSS DES EXTRAKORPORALEN KREISLAUFS

Für den Anschluß des extrakorporalen Kreislaufes werden wegen ihrer Größe und ihrer oberflächlichen Lage die Femoralarterie und Vene verwendet. Nach der Rasur und Desinfektion beider Schenkelinnenflächen sowie der Fixation in Rückenlage wird die Hautinzision unter sterilen Kautelen über den tastbaren Puls der Arteria femoralis etwa 3-4 cm lang angelegt. Dann werden beide Gefäße unter Schonung der im Operationsgebiet verlaufenden kleineren Gefäße und vor allem unter Schonung des Nervus femoralis freipräpariert.

Um die spätere einwandfreie Kanülierung sicherzustellen, müssen beide Gefäße vollkommen von anhaftendem Bindegewebe befreit werden. Nachdem jetzt beide Gefäße frei von ihrer Unterlage abgehoben und gut zugänglich im Wundgebiet liegen, wird um jedes Gefäß möglichst weit distal eine Ligatur mit Vicryl-Faden (Fa. Ethicon 2metric) gelegt, gut festgezogen und verknötet. Eine zweite Ligatur wird proximal um die Gefäße gelegt, aber noch nicht festgezogen.

Nach einer ca. 1 mm langen Inzision in die Gefäßwand werden ihre Ränder mit 2 Pinzetten gehalten und der mit sterilem Gleitmittel beschichtete Katheter durch die entstandene Öffnung bis cranial der Aortenaufteilung aber noch caudal der Abzweigung der Arteria renalis geschoben.

Um beim Einführen der Katheter Blutungen zu vermeiden, wird die proximale Ligatur leicht angezogen und erst nach dem Durchschieben der Katheter festgezogen und verknötet. Wegen der Thrombosierungsgefahr und um die Fließeigenschaften des Blutes zu erhalten, bekommen die Tiere 1000 E Heparin (Thrombophob^R) über den venösen Katheter zugeführt. Für die Dauer des Versuchs wird die Hautwunde provisorisch mit Einzelheften verschlossen.

Nach dem Abhängen vom extrakorporalen Kreislaufs werden diese Hefte, ebenso wie die proximalen Ligaturen, wieder gelöst, um die Katheter zu entfernen.

Nachdem diese vorsichtig herausgezogen worden sind, werden die Gefäße ligiert und die Hautwunde mit Einzelheften verschlossen. Da die chirurgischen Manipulationen unter sterilen Bedingungen stattfinden, wird auch im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses auf eine Antibiose verzichtet.

3.2.5.6. TECHNIK DES EXTRAKORPORALEN KREISLAUFS

Nach Anschluß der beiden Katheter an das Schlauchsystem des extrakorporalen Kreislaufs fließt das Blut aus der Arteria femoralis über den Arterienkatheter und den an diesen angeschlossenen Schlauchsystem in ein Wasserbad. In diesem ist es spiralig aufgewickelt, um eine möglichst große Oberfläche für den Wärmeaustausch zwischen dem Wasserbad und dem Blut zu erhalten. Das jetzt auf die je nach Versuchsgruppe gewünschte Temperatur aufgeheizte Blut kommt über das Schlauchsystem zur Rollerpumpe (Fa. Stöckert, München) und wird dann von dieser wieder dem Körperkreislauf über den venösen Katheter zugeführt. Ein Manometer zeigt den Perfusionsdruck an, mit dem das erwärmte Blut in den Tierkörper zurückgepumpt wird. Der Perfusionsdruck liegt zwischen 20 und 35 mmHg. Zwischen Rollerpumpe und venösen Katheter werden noch 3-Wege-Hähne zur Medikamentenapplikation und zur Blutentnahme zwischengeschaltet; am Schlauchsystem des arteriellen Katheters ist ein 3-Wege-Hahn für die arterielle Druckmessung angeschlossen. Vor Beginn der Versuchsdurchführung wird das Schlauchsystem des extrakorporalen Kreislaufs mit 18 ml Hämaccel^R (-Behring) als Plasmaersatz aufgefüllt. Am Ausgang des Wärmeaustauschers ist im Schlauchsystem ein Temperaturmeßfühler angebracht, der die Temperatur des Blutes anzeigt.

3.2.5.7. TEMPERATURMESSUNG UND MONITORING

Für die Temperaturmessung werden 5 Temperaturfühler verwendet, deren Temperaturwerte digital gemessen und in 20-minütigem Abstand protokolliert werden.

Die Kerntemperatur, die der Kontrollparameter für die angestrebte Hyperthermie ist, wird rektal über einen ca. 10 cm weit eingeführten Fühler gemessen. Zur Ermittlung der Umgebungstemperatur der Tumoren wird ein subkutan liegender Fühler verwendet. Zwei weitere Meßfühler sind im Silikonschlauchsystem integriert und ermitteln die Bluttemperatur einmal bei Austritt und einmal bei Eintritt in den Tierkörper. Der fünfte Temperaturfühler ist im Wasserbad installiert und erlaubt dessen Temperaturkontrolle.

Zur Beurteilung der Herztätigkeit und für die Aufzeichnung der Pulsfrequenz wird ein EKG angeschlossen. Die arterielle Druckmessung wird über einen 3-Wege-Harn im arteriellen Schenkel des Extrakorporalen Kreislaufs durchgeführt.

3.2.5.8. DURCHFÜHRUNG DER HYPERTHERMIE

Nach Anschluß der Kaninchen an den extrakorporalen Kreislauf und die Meßapparaturen wird die Temperatur des Wasserbades langsam gesteigert und so über einen Wärmetausch die Bluttemperatur ebenfalls angehoben. Da ab Temperaturen von 44⁰C eine Schädigung der Blutzellen nicht auszuschließen ist, liegt die obere Grenze der Bluttemperatur unter diesem Bereich. Die Temperatur des Blutes liegt nach dem Wärmeaustausch etwa 1⁰C unter der des Wasserbades, deswegen wird dessen Temperatur auf 45⁰C limitiert.

Damit ein langsamer und schonender Erwärmungsprozeß gewährleistet ist, beträgt die Temperaturdifferenz zwischen Wasserbad und Blut nicht mehr als 2°C .

Auf diese behutsame Weise vergeht bis zum Erreichen einer Hyperthermie Temperatur von $42,5^{\circ}\text{C}$ in der Regel mindestens 60 Minuten, in Einzelfällen kann diese Aufheizphase bis zu 90 Minuten betragen. Um einen Wärmeverlust über das Schlauchsystem des extrakorporalen Kreislaufes sowie den Wärmeverlust der Körperoberfläche der Tiere zu verhindern, werden sowohl die Kaninchen wie auch das Schlauchsystem mit einer Wärmereflexionsfolie (Fa. Sirius Söhngen GmbH) umhüllt.

Da die Versuchstiere bereits nach einer Temperaturerhöhung etwa um 1°C eine hochfrequente hechelnde Atmung entwickeln, werden sie zusätzlich mit Hilfe einer lose über die Schnauze gelegten Atemmaske oxygeniert.

Nach Beendigung der Hyperthermie werden die Tiere durch die Verringerung der Wasserbadtemperatur bis auf eine Rektaltemperatur, die $0,5^{\circ}\text{C}$ über der jeweils gemessenen Ausgangstemperatur liegt, abgekühlt. Auch dieser umgekehrte Vorgang dauert in der Regel wieder 60 Minuten. Danach werden der extrakorporale Kreislauf und die Meßapparaturen abgekoppelt und die Katheter operativ entfernt.

3.2.5.9. MEDIKAMENTÖSE VERSORGUNG WÄHREND DER PERFUSION

Nach Einsetzen der intramuskulär verabreichten Ketamin-Xylavin Anästhesie und dem Legen einer Butterflykanüle in die Ohrrendvene werden die Versuchstiere mit einer Initialdosis von 1000 E Heparin (Thrombophob^R - Nordmark) heparinisiert. Sie bekommen als Erhaltungsdosis während des chirurgischen Eingriffs und der Anschlußzeit des extrakorporalen Kreislaufs bis zum Entfernen der Katheter 500 E Heparin pro Stunde. Für die Substitution der Flüssigkeits-

verluste über die Atmung und den Urinabsatz sowie zur Schockprophylaxe erhalten die Tiere eine Mischung aus Ringer-Laktat-Lösung, physiologischer Kochsalzlösung und 5 %iger Glucose im Verhältnis 2 : 2 : 1 per Dauertropfinfusion, wobei zwischen 80 - 150 ml/h infundiert werden. Bei negativen Veränderungen des Base Excess wird dieser Infusionslösung 20 % Natriumbikarbonat bis zur Normalisierung des BE hinzugefügt; bei einem Sistieren des Urinabsatzes über mehr als 60 Minuten wird der Dauertropfinfusion 30 % Mannitlösung zugesetzt. Wenn die Anurie trotzdem anhält, bekommen die Kaninchen das Diuretikum Furosemid (Lasix^R - Hoechst) in einer Dosierung von 10 - 20 mg/Tier intravenös.

Zusätzlich wird im Bedarfsfall symptomatisch therapiert; einsetzendes Kreislaufversagen mit Adrenergika (Novadral^R - Gödecke), Plasmaexpandern und Erhöhung der Dauertropfgeschwindigkeit; Tachykardien von über 350/Min mit β -Blockern (Visken^R - Wander Pharma), Dyspnoe mit einer Erhöhung der O₂-Beatmung und/oder Dimethylbutyramid (Respirot^R-Asid) bukkal.

3.2.5.10. METHODIK DER TUMOR- UND ORGANENTNAHMEN FÜR DIE HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Unter Allgemeinanästhesie wird jeweils einer der drei implantierten Tumoren am 16. Tag, der zweite am 20. Tag und der dritte am 27. Tag post implantationem entnommen. Dies entspricht bei der ersten Tumorentnahme 1 Tag, der zweiten 5 Tage und der dritten 12 Tage nach Anschluß an den extrakorporalen Kreislauf mit oder ohne Hyperthermie.

Das operative Vorgehen bei den Tumorentnahmen entspricht im wesentlichen dem Vorgehen bei den Entnahmen für die Transplantation (siehe Kap. 3.2.5.3.).

Bei den hyperthermierten Tieren treten in der Regel keine größeren Blutungen auf, so daß teilweise auf eine Ligatur der den Tumor versorgenden Gefäße bei der Entnahme verzichtet werden kann. Bei den Tieren mit Spontanverlauf und denen der Kontrollgruppe zum extrakorporalen Kreislauf müssen die Gefäße immer ligiert werden, da sonst mit massiven Blutungen zu rechnen ist.

Nach der vorsichtigen Extirpation des Tumors wird die Hautwunde mit Einzelheften verschlossen, die Geschwulst wird von anhaftendem Bindegewebe befreit, zweimal quer und einmal in der Längsachse geschnitten und sofort in 6%igem Formalin fixiert.

Die Organentnahmen erfolgen nach Euthanasie der Tiere und werden gemäß den üblichen Sektionsanleitungen durchgeführt (27).

3.2.5.11. HISTOLOGISCHE TECHNIK

Nach der Formalinfixierung erfolgt die Parafineinbettung (Paraplast, Fa. Shandon) in der Histocinette PSI (Fa. Pool of Scientific Instruments Ltd. Basel, Schweiz). (Bei den Tumorpräparaten sind z.T. nur die Kapselanteile verwendbar, da das Zentrum der Geschwulst in eine nekrotische Verfüssigung übergegangen ist). Die eingebetteten Proben werden mit dem Serienschmitt-Mikrotom (Fa. Jung, Typ 1130) bei 4 - 5 μ Schnittdecke und mit dem Gefriermikrotom (Fa. Leitz) geschnitten und dann in üblicher Weise auf den Objektträger fixiert, wobei die Tumorschnitte wegen herausfallender Nekroseanteile besonders vorsichtig gehandhabt werden müssen.

Nach dem Aufziehen auf Objektträger werden von jedem Präparat vier Färbungen angefertigt.

1. Hämalaun-Eosin nach Mayer (HE)
2. Elastica-von-Gison (EVG)
3. Elstica-Ladiwig (ELWG)
4. Masson'sche Golder Färbung (Mg) (11,70,83)

Für die Bewertung der Ergebnisse wird vor allem die HE-Färbung herangezogen, da die Farbabstufung zwischen vitalem Gewebe (blau-violett), Nekrose (blau-rötlich) und Stroma (rötlich) eine gute Differenzierung dieser Komponenten zuläßt.

Für die Beurteilung von Blutaustritten aus Gefäßen und von Thrombosierungen ist die Elastika-Ladewig-Färbung die geeignetste. Erythrozyten und Fibrin heben sich leuchtend rot bis orange von grau-braun des grau-blau gefärbten Tumorgewebe und dem Stroma ab. Die Masson'sche Goldner Färbung erlaubt die bessere Differenzierung von Tumorzellen mit rotem Cytoplasma gegenüber dem grün angefarbten Bindegewebe. Diese Färbung erlaubt außerdem die Feststellung, ob sich knorpelige oder knöcherne Anteile im Tumorgewebe befinden.

Die Elastika-Von Gison-Färbung läßt eine genaue Differenzierung der Bindegewebsanteile durch blau-violette Anfärbung der elastischen Fasern zu. Sie ermöglicht außerdem das Erkennen von eventuell vorhandenen gelb gefärbten Muskelfaseranteilen.

3.2.5.12. TECHNIK DER PLANIMETRISCHEN AUSWERTUNG

Mit Hilfe eines Diaprojektors wird der Tumorschnitt auf eine 1 m^2 große Fläche projiziert, die in 1 cm^2 große Kästchen aufgeteilt ist. Um eine einheitliche Auszählung zu gewährleisten, wird der Objektträger mit dem Tumorschnitt an einem Diarahmen befestigt und unabhängig von der Größe des sich auf dem Objektträger befindenden Präparates auf die Fläche projiziert, wobei der Abstand zwischen Projektor und Projektionsfläche so gewählt wird, daß das aus dem Projektor durch den Diarahmen austretende Licht nur die Fläche von 1 m^2 bedeckt. Somit können die Präparate unabhängig von ihrer

jeweiligen Größe gleich ausgezählt werden, wobei sich bei kleineren Präparaten der Anteil des Freiraumes vergrößert, die Größe der Zellen jedoch gleich bleibt.

Ausgezählt werden die 1 cm^2 großen Kästchen nach den Kriterien:

1. Anzahl der 1 cm^2 großen Flächen des Nekroseanteils
2. Anzahl der 1 cm^2 großen Flächen des vitalen Tumorgewebes
3. Anzahl der 1 cm^2 großen Flächen des Tumorstrumas.

Für die Auszählung werden die Schnitte der HE-Färbung verwendet,

Durch die Gegenüberstellung der prozentualen Anteile von vitalem Tumorgewebe und Tumornekrose kann ein Quotient gebildet werden.

3.2.5.13. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die Meßparameter Tumolvolumen und planimetrische Auswertung von Tumorschnitten werden für alle Meßzeitpunkte und für die gemessenen Gruppen der Medianwert und der Interquartialsabstand berechnet.

Es werden für jeden Parameter die Meßwerte zwischen den einzelnen Gruppen verglichen, dann werden die Kruskal-Wallis-Analyse bzw. der Wilcoxon-Mann-Whitney-u-Test, ein verteilungsfreier Test für den multiplen bzw. paarweisen Vergleich von unabhängigen Stichproben, durchgeführt (71).

Die Signifikanzgrenzen liegen bei $p \leq 0,05$ (signifikant) bei $p \leq 0,01$ (hochsignifikant).

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. MAKROSKOPISCHER BEFUND DER TUMOREN

3.3.1.1. SPONTANVERLAUF

Bei der Entnahme zwischen dem 16. und 27. Tag post implantationem erweisen sich unbehandelte Tumore als 3 - 6 cm im Längsdurchmesser große, derbe, meistens ovoide Gebilde, die insgesamt einen homogenen Eindruck vermitteln und dem Druck bei kräftiger Palpation ohne Einbrüche in die Tumorkapsel standhalten. Die den Tumor versorgenden Gefäße sind in der Regel gut sichtbar pulsierend und prall gefüllt.

Beim Anschnitt ist das Tumorgewebe fischfleischähnlich hellgrau bis rosa und bis auf einzelne punktförmige Nekrosen homogen im Erscheinungsbild.

Dieser makroskopische Befund ändert sich mit zunehmendem Tumoralter dahingehend, daß die Nekroseanteile zunehmen und im terminalen Stadium ab dem 40. Tag post implantationem ein kugelförmiges Gebilde vorliegt, das von der Konsistenz und vom Anschnitt her einem reifen Abzeß ähnelt und dann einen Durchmesser von 8-12 cm hat.

3.3.1.2. EXTRAKORPORALER KREISLAUF BEI NORMALTEMPERATUR ÜBER 180 MINUTEN

Die Tumoren dieser Gruppe weisen gegenüber den Tumoren bei Spontanverlauf keine makroskopisch erfassbaren Veränderungen auf.

3.3.1.3. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42⁰C
ÜBER 180 MINUTEN

Die Tumoren dieser Hyperthermiegruppe sind von unbehandelten Tumoren kaum zu unterscheiden. Lediglich bei den Entnahmen innerhalb von 24 Stunden nach der Hyperthermie erscheint die Färbung im Anschnitt mehr grau-weiß und die Konsistenz ist etwas weniger derb, was sich aber bis zur zweiten Entnahme vollständig wieder zurückbildet, so daß ab dem 5. Tag nach der Hyperthermie kein makroskopischer Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe mehr vorliegt.

3.3.1.4. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C
ÜBER 60 MINUTEN

Die Tumoren dieser Gruppe unterscheiden sich makroskopisch nicht von denen der Hyperthermiegruppe 42⁰C über 3 Stunden.

3.3.1.5. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C
ÜBER 120 MINUTEN

Bei den Tumoren dieser Gruppe zeigen sich erstmals deutliche Veränderungen gegenüber den beiden Kontrollgruppen Spontanverlauf und extrakorporaler Kreislauf ohne Hyperthermie. Die Konsistenz der Tumoren wird gummiartig und bei größerem Palpationsdruck reißt die Tumorkapsel. Im Anschnitt ist die Färbung der Geschwulst schmutzig grau und ist mit vereinzelt Petechien durchsetzt. Die Tumorge-

fäße erscheinen schlaff und ohne Pulsation. Nach Anschneiden der Gefäße tritt tropfenweise Blut aus und kommt nach wenigen Minuten von selbst zum Stillstand.

Entnahmen 5 Tage nach der Hyperthermie ergeben einen größeren Nekroseanteil, der bereits in Verflüssigung übergeht.

12 Tage nach Hyperthermie wird die Konsistenz der Kapsel wieder fest, die Nekroseanteile sind teils konfluiert, aber deutlich vom umgebenden Gewebe abgesetzt. Das Bild entspricht einem unbehandeltem Tumor um den 35. Tag post implantationem.

3.3.1.6. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5°C
ÜBER 180 MINUTEN

Die Tumorveränderungen dieser Gruppe sind noch ausgeprägter. Die Konsistenz 24 Stunden nach der Hyperthermie ist gummiartig. Die Tumorkapsel reißt schon bei mäßigen Palpationsdruck.

Im Anschnitt ist die Farbe schmutzig grau, einzelne hämorrhagische Bezirke von Stecknadelkopfgröße sind regellos in der Geschwulst verstreut. Der Tumor ist ödematös geschwollen und wölbt sich über die Schnittfläche vor. Die Gefäße haben kaum noch Spannung und keine erkennbare Pulsation mehr, sind aber deutlich gefüllt. Beim Anschneiden der Gefäße tritt wenig sehr dunkles Blut aus, die Blutung steht sofort.

Bei der zweiten Entnahme ist die Tumorkonsistenz brüchig, die Kapsel reißt schon bei geringem Druck. Nur in den Randbezirken ist das Tumorgewebe weißlich, ansonsten ist es grau mit einzelnen grauweißen Bezirken. Die Nekrosen sind teilweise konfluiert verflüssigt und haben eine gelbliche Färbung. Die die Geschwulst versorgenden Gefäße sind nur noch stellenweise auszumachen, die Tumorgroße ist seit der Hyperthermie annähernd konstant geblieben.

12 Tage nach der Hyperthermie ist der Tumor wieder härter in der Konsistenz und die Kapsel wieder fester. Im Anschnitt sind wenige größere Nekroseherde zu sehen, die zentral verflüssigt und am Rande verkäst sind. Die Farbe der Nekrose ist gelblich und deutlich vom weißlichen Restgewebe abzugrenzen.

Die Kapsel ist gummiartig, die versorgenden Gefäße sind wieder zu erkennen. Allerdings scheint ihr Kaliber kleiner geworden zu sein und sie scheinen nicht mehr so fest im umgebenden Bindegewebe eingebettet. Der Tumor nimmt langsam wieder an Größe zu.

3.3.1.7. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 43⁰C ÜBER 60 MINUTEN

Die Veränderungen am Tumorgewebe nehmen weiter zu. Es ist brüchig und die Kapsel reißt fast von selbst auf.

Im Anschnitt sind massive Blutungen in den Tumor zu erkennen. Das Tumorgewebe ist ödematös gequollen. Die Blutversorgung steht still, die Gefäße sind prall mit geronnenem Blut gefüllt und liegen ohne Spannung im umgebenden gallertig gequollenen Bindegewebe.

Diese Befunde sind direkt im Anschluß an die Hyperthermie erhoben, da alle Tiere dieser Gruppe nach 60 Minuten gestorben sind.

3.3.2. MAKROSKOPISCHER BEFUND DER ORGANE

Bei allen Organentnahmen und ihrer Befundung ist zu berücksichtigen, daß diese Entnahmen nach vorheriger Tumorextirpation in Narkose und nach der Tötung der Tiere vorgenommen wurden.

3.3.2.1. SPONTANVERLAUF

Da die Tiere dieser Gruppe alle eine mehr oder weniger ausgeprägte Tumorkachexie aufweisen, ist bei der Sektion kaum mehr Fettgewebe vorhanden. Bei einigen Tieren haben die Subkutis und die serösen Häute ein gelatinöses Aussehen.

In der Lunge sind ab dem 30. Tag post implantationem vereinzelte gelblich weiße stecknadelkopffartige Knötchen zu finden, in deren Umgebung ein leichtes Ödem auftritt. Ebenso finden sich in den Lymphknoten einzelne weißlich umschriebene Knötchen. Die Leber weist eine leichte Schwellung auf, ihre Ränder sind nicht mehr scharf. Ein Kaninchen weist einen Befall des großen Netzes mit Finnen von *taenia pisiformis* auf. Die anderen Organe sind unauffällig.

3.3.2.2. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5°C ÜBER 180 MINUTEN

Da die Organbefunde in dieser Gruppe 12 Tage nach der Hyperthermie ohne besonderen Befund waren, bezieht sich das Folgende auf Entnahmen bei 24 h nach der Versuchsdurchführung euthanasierten Tieren.

Untersucht werden nur 5 Tiere dieser Gruppe, da der Befund übereinstimmend ist. Bei allen Sektionen erweisen sich die Nieren als schlecht durchblutet mit mäßiger Spannung der Organkapsel und einer blassen Färbung im Anschnitt.

Die Lunge weist eine leichte Ödematisierung auf mit Austritt von etwas blasigem gelblich-weißen Schaum beim Anschneiden.

Die Leber ist brüchig. In zwei Fällen bricht sie beim Herausnehmen. Die Leberränder sind scharf und das Organ weist im Anschnitt keine Verwölbung über die Schnittfläche auf. Der Magen-Darm-Trakt ist mäßig aufgegaßt, zeigt jedoch keine Anzeichen einer Entzündung.

Im Herzen finden sich kristalline Ablagerungen des zur Euthanasie verwendeten Barbiturats, der Herzmuskel ist o.b.B.

Der gesamte Tierkörper sowie Gehirn und Lymphknoten weisen teilweise eine geringgradige Ödematisierung auf, ansonsten sind sie unauffällig.

3.3.2.3. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 43⁰C ÜBER 60 MINUTEN

Da alle Tiere dieser Gruppe direkt im Anschluß an die Hyperthermie ad. exitum gehen, also nicht wie die Tiere der anderen Gruppen euthanasiert werden, ist dies bei der Beurteilung der Befunde zu berücksichtigen.

Die 5 untersuchten Versuchstiere weisen eine hochgradige Ödematisierung des gesamten Tierkörpers auf; das Unterhautgewebe, die Lymphknoten, das Gehirn, die Mesenterien und der Magen-Darm-Trakt erscheinen geschwollen und sulzig von gräulich-brauner Farbe.

Die äußerlich sichtbaren Gefäße sind mit Blut gefüllt.

Die Lunge ist hochgradig ödematisiert mit Austritt von gelblichem Exsudat und blasigem gelblich-weißem Schaum am Anschnitt. Die Leber ist geschwollen und von hellbrauner Farbe. Eindrücke bleiben kurze Zeit erhalten, das Gewebe bricht aber nicht.

Bei allen Tieren ist am Herzen eine Herzmuskeldilatation zu finden, die das gesamte Herz betrifft. Die Herzmuskulatur erscheint heller als normal.

3.3.3. MIKROSKOPISCHER BEFUND DER TUMOREN

Histologisch untersucht werden 10 Tiere des Spontanverlaufs und 10 Tiere des extrakorporalen Kreislaufs mit Hyperthermie von 42,5°C über 180 Minuten sowie jeweils 3 Tiere der anderen Gruppen.

3.3.3.1. SPONTANVERLAUF

Beim Schnitt durch den ovoiden Pol eines unbehandelten Tumors strahlen von der kompakten, mit vielen Gefäßen versehenen Bindegewebskapsel regellos Bindegewebssepten in die Geschwulst. Dieses Gewebe ist relativ fein und netzartig verteilt. Es besteht aus Fibroblasten, die in viele retikuläre Fasern eingebettet sind. Von der Kapsel kommen größere Gefäße, die sich entlang der Septen in ein kapillares Netz aufzweigen und damit diese auflockern. Die Kapillaren sind mit Erythrozyten und einzelnen Leukozyten gefüllt. Auch innerhalb des Stromas sind vereinzelt Leukozyten zu finden. Entlang dieser Bindegewebssepten bzw. von ihm umgeben, liegen die Tumorzellinseln.

Die Zellen des Tumorgewebes sind entlang der Septen, besonders in der Nähe von Kapillaren, dicht gepackt, teilweise mit länglichen Formen. Zum Zentrum der Tumorzellinseln hin wird der Zellverband lockerer, die Zellen selbst mehr rundlich. Das Zentrum dieser Inseln ist entweder schon nekrotisch oder die beginnenden Nekrose deutet sich durch die blässere Anfärbung der Zellen an. Das Tumorgewebe besteht aus polymorphen und anaplastischen Zellen von 7 - 18 μ Größe mit einem relativ hohen Mitoseindex. Vereinzelt treten auch mehrkernige Riesenzellen auf. Die Entnahmen am 16., 20. bzw. 27. Tag post implantationem unterscheiden sich lediglich ein Nekroseanteil, ansonsten ist das Schnittbild bei den unbehandelten Tumoren wie oben beschrieben.

3.3.3.2. EXTRAKORPORALER KREISLAUF BEI NORMALTEMPERATUR ÜBER 180 MINUTEN

Gegenüber den histologischen Schnitten des Spontanverlaufs zeigen die Tumoren dieser Gruppe keine lichtmikroskopisch erkennbaren Abweichungen.

3.3.3.3. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42⁰C ÜBER 180 MINUTEN

Bei Entnahmen innerhalb von 24 Stunden nach der Hyperthermie sind an den Tumorzellen selbst keine Veränderungen zu sehen. Die Gefäße an der Tumorperipherie zeigen eine geringgradige Dilatation und Stauung. Gelegentlich sind sog. Endothelzellen "größerer Prominenz" vorhanden, die in das Gefäßlumen hineinragen.

In den Präparaten 5 bzw. 12 Tage nach der Hyperthermie zeigen die Gefäße keine Dilatation mehr. Die Nekroseanteile haben wachstumsbedingt zugenommen.

3.3.3.4. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C ÜBER 60 MINUTEN

Gegenüber der vorherigen Gruppe ist bei der ersten Entnahme eine geringgradig größere Dilatation der Blutgefäße festzustellen, jedoch keine Anzeichen einer Endothelschädigung oder einer Schädigung der Tumorzellen selbst sind zu finden.

3.3.3.5. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C ÜBER 120 MINUTEN

Die Entnahmen innerhalb von 24 Stunden zeigen eine Dilatation sowie Stauung in fast allen Tumorgefäßen, die deutlich ausgeprägter ist als bei denen mit 42⁰C hyperthermierten Tieren.

In einzelnen Bereichen sind Gefäße rupturiert mit Einblutung ins Gewebe. Stellenweise sind Kapillaren thrombosiert und mit Erythrozyten verklumpt.

Die Zentren der Tumorzellinseln zeigen verblassende Tumorzellen mit Kernpyknosen und vereinzelt Blutgerinnseln. Die Inseln sind vom Stroma "abgedrückt", was auf eine Ödematisierung dieser Randzonen zurückzuführen ist.

5 Tage nach der Hyperthermie ist die nekrotische Zone im Zentrum der Tumorzellinseln größer geworden. Die an diese Zone angrenzenden Tumorzellen sind blaß angefärbt und weisen Kernpyknosen auf. Vereinzelt sind im Stroma noch rupturierte Kapillaren zu erkennen, umgeben von Phagozyten, die auch in den Tumorzellbereich einzuwandern beginnen.

12 Tage nach Hyperthermie bietet sich das Bild einer RepARATION. Die Zentralnekrosen sind noch größer geworden und bilden eine homogene Masse aus Detritus sowie eingewanderten Leukozyten. Die um diese Nekrose herumliegenden Tumorzellen sind gut anfärbbar und unterscheiden sich nicht von Zellen im unbehandelten Tumor. Die ödematisierte Zone zwischen Stroma und Tumorzellinsel hat sich zurückgebildet.

3.3.3.6. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5°C
ÜBER 180 MINUTEN

Die histologischen Schnitte einen Tag nach der Hyperthermie zeigen ausgedehnte hämorrhagische und nekrotische Bezirke mit stellenweise zerstörten Tumorkapillaren. Tumorgewebe und Stroma sind durch Spalträume getrennt, das Stroma ist ödematisiert aufgelockert, die darin liegenden Gefäße teils rupturiert, teils thrombosiert. Einige dilatierte Gefäße zeigen Endothelablösungen und enthalten keine Blutzellen mehr.

Die Anfärbung der Tumorzellen ist nur noch gering und zeigt alle Farbübergänge von blaß-rosa bis bläulich-violett bei der HE-Färbung. Kerne sind nur noch schlecht zu erkennen und zeigen alle Stadien der Karyolyse, teilweise sind bei erhaltenen Zellgrenzen keine Kerne mehr zu sehen.

5 Tage nach der Hyperthermie ist dieses Bild noch ausgeprägter. Außer schmalen Randzonen von vitalen dunkelviolett gefärbten Tumorzellen bei der HE-Färbung ist der Tumor homogen blaß rötlich gefärbt. Die Nekrose setzt sich vom kleinen verbliebenen Randsaum vitaler Zellen deutlich ab. Bei 75facher Vergrößerung sind Kernreste, Erythrozyten und vom Stroma her einwandernde Granulozyten zu erkennen. Die Kapillaren sind dilatiert. Es gibt mit Erythrozyten und mit relativ vielen Leukozyten gefüllte sowie auch "leere" Gefäße.

12 Tage nach der Hyperthermie ist die Nekrose noch deutlicher vom vitalen Gewebe, das jetzt wieder voll angefärbt ist, abzugrenzen. In die Zwischenräume zwischen den vitalen Randsaum und der Nekrose schiebt sich vom Stroma aus Granulationsgewebe. Die Nekrose selbst ist eine homogene Masse aus Zelltrümmern, im Zentrum dieser Nekrosen sind keine Zellbestandteile mehr erkennbar.

Die reichlich sprossenden neuen Kapillaren zeigen keine abweichenden Veränderungen und auch die nicht im Granulationsgewebe verlaufenden Gefäße zeigen wieder das normale Bild.

3.3.3.7. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 43°C ÜBER 60 MINUTEN

Im gesamten Tumor sind hämorrhagische Bezirke, in denen die austretenden Erythrozyten das Bild bestimmen. Soweit noch Tumorgefäße aufzufinden sind, sind diese dilatiert und thrombosiert.

Das Stroma ist stark ödematisiert und mit Erythrozyten durchsetzt, die elastischen Fasern sind spiralig aufgerollt.

In den Tumoringeln lassen sich noch einzelne Bezirke mit scheinbar intakten Geschwulstzellen ausmachen.

Im restlichen Tumorgewebe sind die Zellgrenzen nicht mehr zu erkennen, die Zellkerne pyknotisch oder nicht mehr vorhanden.

Durch den massiven Austritt von Erythrozyten und Fibrin ist der gesamte Schnitt fast homogen eingefärbt, so daß außer in den Randbezirken keine genaue Differenzierung mehr möglich ist.

3.3.4. MIKROSKOPISCHE BEFUNDE DER ORGANE

3.3.4.1. SPONTANVERLAUF

Entnahmen zwischen 25. und 30. Tag post implantationem zeigen eine Metastasierung des VX₂-Tumors in Lunge und Lymphknoten verbunden mit einem Ödem der betroffenen Bezirke und einer vermehrten Einwanderung von Zellen des Abwehrsystems.

Ansonsten weisen die Organe dieser Tiere keine auffälligen Veränderungen gegenüber Organschnitten von normalen gesunden Kaninchen auf.

3.3.4.2. MIKROSKOPISCHE VERÄNDERUNGEN DER ORGANSCHNITTE NACH EXTRAKORPORALEM KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C ÜBER 180 MINUTEN

1. Gehirn

Untersucht werden 2 Großhirnschnitte 24 Stunden nach Hyperthermie und ein Präparat 12 Tage danach.

Bei den beiden Entnahmen 24 Stunden nach der Hyperthermie weisen die Präparate ein geringgradiges Ödem im perivaskulären Bereich auf. Die Nervenzellen zeigen keine lichtmikroskopischen Veränderungen. 12 Tage nach Hyperthermie sind keine Veränderungen mehr vorhanden.

2. Lunge

Untersucht werden 2 Lungenschnitte 24 Stunden und 2 Schnitte 12 Tage nach der Hyperthermie.

Die beiden Schnitte 24 Stunden nach Hyperthermie ergeben größtenteils intakte Lungenbläschen. Vereinzelt sind Alveolenwände zerrissen, so daß ein mehrere Alveoli umfassendes Emphysem entsteht. Die Gefäße des Bronchialbaumes sind zum großen Teil mit Erythrozyten gefüllt, das Interstitium und die Alveolenwände machen in einzelnen Abschnitten einen gequollenen Eindruck und zeigen einen Austritt von Ödemflüssigkeit aus dem Interstitium in die Alveolen.

Die Schnitte 12 Tage nach Hyperthermie zeigen eine Einwanderung von Granulozyten und die Bildung von Reparationsgewebe in den Bereichen, in denen eine emphysematöse Schädigung vorliegt. Vereinzelt treten Atelektasen auf.

3. Niere

Untersucht werden wiederum 2 Schnitte 24 Stunden nach Hyperthermie und 2 Präparate 12 Tage danach.

Bei den Schnitten 24 Stunden nach der Hyperthermie fällt zunächst die Blutleere des Organs auf. Nur stellenweise sind in den Gefäßen und den Glomerula Erythrozyten zu finden. Einige Gefäße sind mit Mikrothromben verstopft und an wenigen Stellen sind die Glomerula und die Tubuli mit Fibrin gefüllt. Unregelmäßig verteilt liegen Verstopfungen von Tubuli mit Plasmaproteinen vor.

12 Tage nach Hyperthermie weisen die Schnitte eine normale Blutfülle auf. Einzelne kleine Nekrosen im Bereich der Glomerula sind unregelmäßig über die Schnittfläche verteilt und deutlich vom Reparationsgewebe demarkiert. Die Tubuli weisen keinerlei Veränderungen mehr auf.

3.3.5. PLANIMETRISCHE AUSWERTUNG VON TUMORSCHNITTEN

3.3.5.1. PLANIMETRISCHE AUSWERTUNG VON TUMORSCHNITTEN DES SPONTAN- VERLAUFS

Die Entnahmen unbehandelter Tumoren am 16. Tag post implantationem ergeben bei 5 ausgewerteten Kaninchen einen durchschnittlichen Anteil von 32 % Nekrose zu 68 % vitalem Gewebe. Der niedrigste Nekroseanteil ist bei 26 %, der höchste bei 42 %.

Tier	% Nekrose	% vital
1	26	74
2	33	67
3	42	58
4	28	72
5	31	69
Mittelwert	32	68

Bei den Entnahmen am 21. Tag post implantationem ergeben sich bei 5 ausgewerteten Tumorschnitten ein durchschnittlicher Anteil von 43 % Nekrose zu 57 % vitalem Tumorgewebe, wobei der geringste Nekroseanteil bei 39 %, der höchste bei 47 % liegt.

Tier	% Nekrose	% vital
1	39	61
2	44	56
3	42	58
4	47	53
5	43	57
Mittelwert	43	57

Am 27. Tag post implantationem ergibt sich bei 5 ausgewerteten Schnitten ein Durchschnitt von 56 % Nekrose zu 44 % vitalem Tumorgewebe.

Die Schwankungsbreite des Nekroseanteils reicht von 51 - 59 %.

Tier	% Nekrose	% vital
1	51	49
2	56	44
3	59	41
4	56	44
5	58	42
Mittelwert	56	44

3.3.5.2. Planimetrische Auswertung von Tumorschnitten bei
extrakorporalem Kreislauf mit Hyperthermie von 42,5⁰C
über 180 Minuten

Bei den Entnahmen 24 Stunden nach Hyperthermie liegt der Nekroseanteil im Durchschnitt bei 89 %, der Anteil an vitalem Tumorgewebe bei 11 %.

Ausgewertet werden 5 Tumorschnitte, wobei der Nekroseanteil eine Schwankungsbreite von 87 % - 93 % aufweist.

Tier	% Nekrose	% vital
1	87	13
2	93	7
3	93	7
4	92	8
5	90	10
Mittelwert	89	11

Entnahmen 5 Tage nach Hyperthermie ergeben einen durchschnittlichen Nekroseanteil von 93 % und einen durchschnittlichen Anteil von vitalem Gewebe von 7 %.

Der höchste Nekroseanteil liegt bei 96 %, der niedrigste bei 90 % bei wiederum 5 ausgewerteten Schnitten.

Tier	% Nekrose	% vital
1	90	9
2	92	8
3	93	7
4	94	6
5	96	4
Mittelwert	93	7

Bei den Entnahmen 12 Tage nach Hyperthermie ergibt sich ein durchschnittlicher Nekroseanteil von 88 % gegenüber 12 % Anteil an vitalem Gewebe.

Die Schwankungsbreite des Nekroseanteils reicht von 87 % bis 96 %.

Tier	% Nekrose	% vital
1	87	13
2	96	4
3	89	11
4	87	13
5	87	13
Mittelwert	88	12

3.3.5.3. VERGLEICH DER PLANIMETRISCHEN AUSWERTUNGEN DES SPONTAN-
VERLAUFS UND VON HYPERTHERMIE 42,5⁰C ÜBER 180 MINUTEN

1. Am 16.Tag post implantationem ergibt sich bei der
Gegenüberstellung des durchschnittlichen Nekroseanteils

Spontanverlauf	Hyperthermie 42,5 ⁰ C über 180 Minuten
----------------	---

32 %

89 %

Dies entspricht einer absoluten Erhöhung des Nekroseanteils um 57 %; also einer Erhöhung vom 2,78 fachen des Wertes für den Spontanverlauf. Die nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test ermittelte Signifikanz beträgt $p < 0,01$ und ist damit hochsignifikant.

2. Die Gegenüberstellung am 21. Tag post implantationem ergibt
einen durchschnittlichen Nekroseanteil von

Spontanverlauf	Hyperthermie 42,5 ⁰ C über 180 Minuten
----------------	---

43 %

96 %

Damit erhöht sich der Nekroseanteil nach Hyperthermie um 43 %, dies bedeutet eine Verdopplung dieses Anteils. Die hierbei ermittelte Signifikanz beträgt ebenfalls $p < 0,01$.

3. Am 27. Tag post implantationem ergibt der Vergleich beider Gruppen einen durchschnittlichen Nekroseanteil von

Spontanverlauf	Hyperthermie 42,5 ⁰ C über 180 Minuten
----------------	---

50 %

88 %

Hier erhöht sich der Nekroseanteil absolut um 32 %, also nur noch um das 0,57 fache. Auch hier beträgt die Signifikanz $p < 0,01$.

3.3.6. TUMORVOLUMEN

Da die Tumolvolumenbestimmungen ebenso Teil dieser Arbeit wie Teil parallel durchgeführte Arbeiten (2,90) sind, wird im folgenden nur kurz darauf eingegangen. Die Messung der Tumolvolumina erfolgte in vivo mit einer Schublehre (Fa. Elinox) in 3 Ebenen im Abstand von 3 Tagen.

Etwa eine Woche nach der Implantation können die Tumoren als harte rundliche Knötchen getastet und von da an auch vermessen werden. Wie aus den Messungen des Spontanverlaufs hervorgeht (siehe Abb. 6) ist das Wachstumsverhalten in den ersten 4 Wochen gleichförmig exponentiell. Ab diesem Zeitpunkt ist die Nekrose im Tumor so groß und von Tier zu Tier und von Tumor zu Tumor so unterschiedlich, daß die Messungen keine gesicherte Aussage über das Tumorstadium mehr zulassen.

Die Standardabweichung beträgt ab dem 30. Tag post implantationem $\pm 10,8 \text{ cm}^3$ bei einer durchschnittlichen Tumorstöße von $37,4 \text{ m}^3$. Die Tumolvolumenbestimmung der mit $42,5^\circ\text{C}$ über 180 Minuten hyperthermierten Kaninchen ergibt eine Wachstumshemmung über 6 - 9 Tage (2) (siehe Abb. 3 + 4 + 5). Danach gleicht sich das Wachstum der hyperthermierten Neoplasmen wieder dem des Spontanverlaufs an. Eine Überprüfung der mittels Schublehre erhaltenen Volumina erfolgte bei 10 Tieren am 14. Tag post implantationem mit dem Computertomogramm.

Bei den Messungen mit der Schublehre ergibt sich ein mittleres Tumorstadium von $8,19 \pm 0,9 \text{ cm}^3$ bei den CT-Messungen von $8,19 \pm 0,77 \text{ cm}^3$. Bei der Bestimmung der Korrelation ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,724$ nach der Korrelationsgleichung $y = 0,62x + 2,59$. Die Signifikanz beträgt hierbei $p = 0,0178$.

Mit Hilfe des Computertomogramms wird außerdem der Volumenanteil der Tumornekrosen bestimmt, der am 14. Tag post implantationem bei 32 % liegt und am 16. Tag, also einen Tag nach einer Hyperthermie von 42,5⁰C über 180 Minuten sich auf 85 % erhöht (90). Dies entspricht einer Signifikanz von $p < 0,01$. 5 Tage nach der Hyperthermie vermindert sich der Nekroseanteil auf 81,9 % bei den hyperthermierten Tieren, während es bei der Spontanverlaufsgruppe zum gleichen Zeitpunkt auf 40,5 % ansteigt.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der Makro- und Mikro-Morphologie der Tumoren und untersuchten Organe, die planimetrische Auswertung von Tumorschnitten und der Tumervolumenbestimmung behandelt.

Die Untersuchung der Blutparameter (19), die xeroangiographischen (2) und computertomographischen Untersuchungen, sowie die technische Versuchsanordnung (90) sind Gegenstand parallel durchgeführter Arbeiten. Die Ergebnisse aus diesen Arbeiten werden gegebenenfalls in dieser Diskussion mitverwendet.

4.1. VERSUCHSANORDNUNG:

Der kaninchenspezifische VX_2 -Experimentaltumor sowie auch das Kaninchen als Versuchstier eignen sich für Untersuchungen zur extrakorporal-induzierten Ganzkörperhyperthermie. Zahlreiche Arbeiten belegen sowohl die Hitzesensibilität (17,56,57,58,59,76) die gute Übertragbarkeit des Tumors und sein konstantes Wachstumsverhalten (31,38,42,55,56,82).

Die Körpergröße des Versuchstieres Kaninchen ermöglicht eine relativ einfache Kanülierung der femoralen Gefäße. Sie sind, da das Kaninchen die Hauptarbeit der Fortbewegung mit den Hinterextremitäten vollzieht, schon physiologisch für einen je nach Arbeitsleistung des Tieres stark unterschiedlichen Gefäßinnendruck angelegt, und verkraften den beim Anschließen des extrakorporalen Kreislaufs kurzzeitig möglichen Überdruck besser als Tiere, deren Anatomie eine andere Verteilung der Arbeit zwischen Vorder- und Hinterextremität aufweisen.

Ein weiterer Vorteil ist die oberflächliche Lage der femoralen Gefäße, so daß ein chirurgischer Zugang ohne größere Irritation des umliegenden Gewebes möglich ist.

Der bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Implantationsort dorsal am Hals bietet hinsichtlich der angestrebten Untersuchungen den Vorteil, daß die Haut des Kaninchens an dieser Stelle sehr dünn und leicht gegenüber der Unterlage verschieblich ist. Dadurch sind die derben Tumoren in vivo gut von der harten Unterlage der Wirbelkörper und der weichen Haut abzugrenzen und auszumessen. Die Auswertungen von Angiographie (2) und Computertomogramm (90) werden durch das Fehlen weiterer Gewebestrukturen ebenfalls erleichtert. Die freie Lage der Geschwulst vereinfacht sowohl ihre Vermessung wie auch den chirurgischen Zugang für Tumorentnahmen.

Die Vorversuche ergeben, daß bis zu 3 Tumoren unabhängig voneinander wachsen können und bis zur 6. Woche post implantationem sowohl palpatorisch wie auch optisch voneinander klar abgrenzbar sind und wie die Angiographie (2) zeigt, eine getrennte Gefäßversorgung haben. Dies ermöglicht mehrere Tumorentnahmen am selben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten. Schon 4 - 6 Tage nach der Implantation sind die Neubildungen palpierbar und nach weiteren 3 Tagen mit der Schublehre meßbar.

Das in den Vorversuchen entwickelte Anästhesieverfahren - eine Vollanästhesie lediglich für die schmerzhaften chirurgischen Eingriffe anzuwenden, und dann für die Zeitdauer des Anschlusses an den extrakorporalen Kreislauf auf eine tiefe Sedation überzugehen - läßt die Tiere, die mit dem Versuch verbundene Kreislaufbelastung gut verkraften und beeinhaltet die Möglichkeit einer weiteren Verlängerung der Hyperthermiezeiten, was bei den üblicherweise angewendeten Barbituratanästhesien (17,38,58,59) zu einem immer größeren Risiko wird.

4.2. SPONTANVERLAUF:

Die Untersuchungen des Spontanverlaufs bestätigen die in der Literatur gemachten Angaben über den VX_2 -Tumor. Kidd and Rous (42) beschreiben schon 1940 die leichte Übertragbarkeit, die Konstanz des Wachstums und die Malignität dieses, sich aus einem an sich gutartigen Kaninchenpapillom entwickelten Experimentaltumors. Dies wird 1972 von Mashima et al. (51), 1979 von Young et al. (96,97) und Johannes 1984 (38) bestätigt.

Damit ist dieser Tumor seit über 45 Jahren mit gleichbleibendem Verhalten für die wissenschaftliche Forschung verfügbar und läßt damit objektivierbare und reproduzierbare Ergebnisse zu. Bei der in der vorliegenden Arbeit gewählten Implantationsstelle in der Subcutis des dorsalen Halses und Rückens liegt die Größenzunahme der Geschwulst zwischen der der intramuskulären Implantation und der Implantation des VX_2 in die Leber, wo die größten Wachstumsraten auftreten (97). Der Druck des umgebenden Gewebes auf den sich entwickelnden Tumor sowie seine Vaskularisierung sind neben der Malignität der verwendeten Tumorzell-Linie ausschlaggebend für die Größenzunahme (97). Der mangelnde Umgebungsdruck und wie xeroangiographisch nachgewiesen werden kann (2) gute Vaskularisation führen zu einem exponentiellen Wachstum bis zum 36. Tag post implantationem, um dann langsam abzufallen, was mit den Angaben in der Literatur korreliert (38,42,96).

Alle implantierten Tumoren wuchsen wie in der Literatur beschrieben expansiv verdrängend (42) und nicht wie andere maligne Neoplasmen infiltrativ (72). Es gibt bei den eigenen Untersuchungen nie eine Tumordinfiltration in Haut, Rückenmuskulatur, Wirbelkörper oder Wirbelkanal.

Die Implantation des VX_2 an der von uns gewählten Stelle hat allerdings den Nachteil, daß der Tumor leicht nach außen aufbrechen kann, was um den 45. Tag post implantationem eintritt, so daß ab

diesem Zeitpunkt keine Ergebnisse mehr zu ermitteln sind und die Tiere aus tierschützerischen Gründen in der 7. Woche post implantationem schmerzlos getötet werden.

Die Organuntersuchungen belegen das ebenfalls in der Literatur beschriebene Auftreten von Metastasen in Lunge und Lymphknoten (42), die die ab der 5. Woche post implantationen auftretende Tumorkachexie weiter verschlimmern, so daß auch aus diesem Grunde die Euthanasie der Tiere durchgeführt und auf die Ermittlung von Überlebenszeiten verzichtet wird.

4.3. EXTRAKORPORALER KREISLAUF BEI NORMALTEMPERATUR

Diese Versuche werden gemacht, um zu sehen, ob die alleinige Durchführung des beim VX₂-Tumoren tragenden Kaninchen bisher noch nicht angewandten extrakorporalen Kreislaufs zu einer Tumorbeeinflussung führt.

Sowohl makro- wie mikromorphologisch ist kein Unterschied zu den Spontanverläufen zu erkennen. Angerer (2) findet eine minimale Verlangsamung des Tumorwachstums, die eventuell auf die mit dem Anschluß des extrakorporalen Kreislaufs verbundenen Narkose und operationsbedingten Belastungen zurückzuführen ist.

4.4. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42°C ÜBER
180 MINUTEN UND EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE
VON 42,5°C ÜBER 60 MINUTEN

Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsreihen sind so ähnlich, daß sie zusammen besprochen werden. Die makroskopisch und histologisch festgestellten Veränderungen lassen keinen ausgeprägten Unterschied zwischen beiden Gruppen erkennen und weisen lediglich geringe Veränderungen gegenüber unbehandelten Tumoren des Spontanverlaufs auf.

Da die Wirkung der Hyperthermie ein Produkt aus Zeit und Temperatur ist, also wie Dickson (18) feststellte, bei längeren Hyperthermiezeiten niedrigere Temperaturen ausreichen, ist in diesem Fall die Erhöhung der Temperatur um 0,5°C annähernd gleichbedeutend wie eine 120 Minuten längere Hyperthermiezeit. Johnson (39) erreicht mit 43,5°C über 180 Minuten das gleiche Ergebnis an Rattentumoren wie mit 45°C über 60 Minuten.

Trotz der makro- und mikromorphologischen Ähnlichkeit beider Gruppen zeigt sich hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit ein Unterschied. Bei der Gruppe 42,0°C über 180 Minuten bleibt sie hinter der Kontrolle zurück, bei der Gruppe 42,5°C über 60 Minuten wachsen die Tumoren schneller als bei der Spontanverlaufsgruppe (siehe Abb. 5) (2).

Dickson (18) erklärt dieses Phänomen damit, daß größere Tumoren längere Zeit überwärmt werden müssen, damit Tumorgroße und Hyperthermiezeit miteinander korrelieren. Er kommt zusammen mit anderen Untersuchern zu der Vermutung, daß die Ganzkörperhyperthermie eine Suppression der immunologischen Kompetenz auslöst, die sie mit den unterschiedlichen Überlebenszeiten nach Ganz- und Teilkörperhyperthermie erklären (17,76). Gee et al. (26) stellen am Menschen eine Lymphozytensuppression nach Hyperthermie von 41,8°C über 240 Minuten fest, die 3 bis 4 Tage später zu einer reaktiven Umkehr dieses Phänomens führt, um nach einer Woche wieder die vor

der Hyperthermie gemessenen Werte zu erreichen. Diese durch zu kurze Hyperthermiezeiten und durch die Hyperthermie an sich ausgelöste Immunsuppression könnte auch in diesem Fall die Ursache für das kurzzeitige Ansteigen des VX_2 -Tumorstadiums sein.

4.5. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON $42,5^{\circ}C$ ÜBER 120 MINUTEN

In dieser Gruppe treten erstmalig deutliche Veränderungen auf. Die Konsistenz der Tumoren wird weicher, im Anschnitt sind Petechien zu sehen, die als mikromorphologisches Äquivalent rupturierte und thrombosierte Kapillaren zeigen. Angerer (2) kann angiographisch die in der Literatur beschriebene Stase in Tumorgefäßen zeigen (25,8).

Im Zentrum der Tumoreinseln sind keine Zellstrukturen mehr zu erkennen, um die Zentren herum treten alle Formen der Karyolyse auf, wobei Kernpyknoten vorherrschen.

Bereits nach 5 Tagen beginnt sich die Geschwulst wieder zu regenerieren, Leukozyten wandern vom Stroma in Richtung der Nekrosen, die die einzigen verbleibenden Schäden bilden. Diese Regenerationen werden ebenfalls von Palzer und Heidelberger (63) beschrieben. Giovanelli et al (28) vermuten einen engen Zusammenhang zwischen der Hitzeempfindlichkeit von Tumorzellen und diesen "Repair-Mechanismen". Angerer (2) kann zeigen, daß die Wachstumskurve des VX_2 -Experimentaltumors weniger steil verläuft, eine Tumorstadiumverdoppelung erst nach 10 Tagen im Vergleich zu 6 Tagen beim Spontanverlauf auftritt.

4.6. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 42,5⁰C ÜBER 180 MINUTEN

Diese Gruppe erweist sich als die mit den größten therapeutischen Effekt. Das Tumorwachstum verlangsamt sich signifikant (2) (siehe Abb. 3 + 5). Der Zeitpunkt der Tumolvolumenverdoppelung liegt bei 12 Tagen im Gegensatz zu 6 Tagen beim Spontanverlauf.

Makroskopisch sind die Tumoren einen Tag nach Hyperthermie grau verfärbt, ödematisiert und mit Hämorrhagien durchsetzt und von schwammiger Konsistenz. Mikroskopisch sind Tumorzellen und Stroma durch Ödeme und Fibrin-gefüllte Spalträume getrennt, die die nur noch durch Diffusion mögliche Ernährung der Tumorzellen verlangsamt oder sogar unmöglich macht. Dies führt aus den im Literaturteil angeführten Gründen zu einer Übersäuerung im Tumor (4) mit den daraus resultierenden Folgen. .

Die Gefäße der Geschwulst sind thrombosiert und rupturiert mit Fibrin und Erythrozytenaustritten ins Stroma und in die zentralen Nekrosen. Diese entsprechen dem Bild einer Koagulationsnekrose und bilden eine homoge eosinophile Masse (24,72), um die der verbleibende Rest vitaler Zellen blasser als normal angefärbt ist und in den Übergangszonen alle Formen der Karyolyse aufweist, was auch Muckle und Dickson (57) am VX₂-Experimentaltumor nachweisen können.

Nach 12 Tagen bietet sich das Bild einer RepARATION, die Nekrose ist annähernd gleich groß geblieben, aber deutlich vom jetzt wieder voll angefärbten Vitalgewebe abgrenzbar. Vom Stroma aus schieben sich Fibroblasten und Kapillaren in die durch Ödeme und fibringefüllten Räume. In die Nekrose sind Leukozyten in großer Zahl eingewandert, um den Detritus zu phagozytieren. Diese massive Leukozyteneinwanderung könnte auf die von Gee et al. (26) beschriebene Umkehr der hyperthermiebedingten Immunsuppression zurückzuführen sein.

Dickson (18) beschreibt ähnliche Befunde bei mit Hilfe von Wasserbädern und Mikrowellen überwärmten VX_2 -Tumoren. Er hält eine Zeitspanne von 180 Minuten für nötig, um dauerhafte Schäden zu verursachen, die er erst bei Eintritt vollständiger Nekrosen als gegeben ansieht.

Bei einer durchschnittlichen Rektaltemperatur der Kaninchen von $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ beträgt die Temperaturerhöhung im Mittel $3,5^\circ\text{C}$, was einer extremen Hyperthermie entspricht.

4.7. EXTRAKORPORALER KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE VON 43°C ÜBER 60 MINUTEN

Da alle Tiere in dieser Versuchsreihe innerhalb von 60 Minuten nach der erreichten Temperaturhöhe sterben, wird sie auf 5 Tiere beschränkt.

Bei der Sektion sind die Tumoren brüchig mit starken Hämorrhagien durchsetzt. Auch histologisch beherrschten hämorrhagische Fibrin- und Ödem-gefüllte Räume das Bild. Kerne und Zellgrenzen des Tumorgewebes sind nicht mehr klar zu erkennen.

Die Literatur berichtet von Hyperthermien bis zu 45°C (13,18,-49,93). Crile (15) erhitzt bei Menschen chirurgisch aufbereitete Osteosarkome sogar auf 47°C .

Da aber in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen kein Tier eine Hyperthermie von 43°C überlebt, ist es denkbar, daß die direkte Erhitzung des Blutes auch eine größere Schädigung der Gefäßwände bewirkt und somit die Temperaturtoleranz sinkt. Die von Ardenne und Mitarbeitern beschriebene Versteifung der Erythrozytenmembran (3,4) könnte bei einem direktem Angriff der Hyperthermie auf das Blut noch weiter verstärkt werden und so auch die von uns beobachtete Stase in größeren Gefäßen erklären.

TU-Volumenwachstumsgeschwindigkeit 1.-6. Tag nach HT

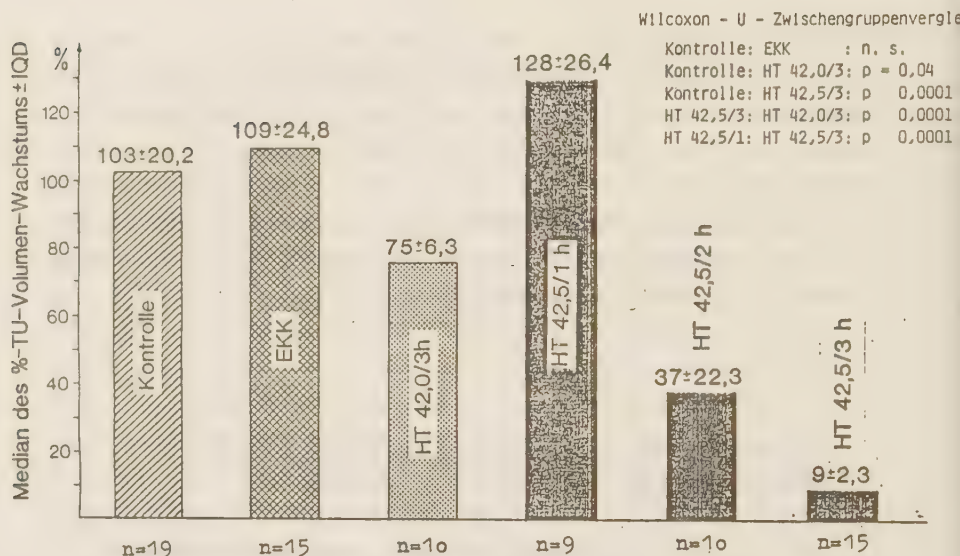
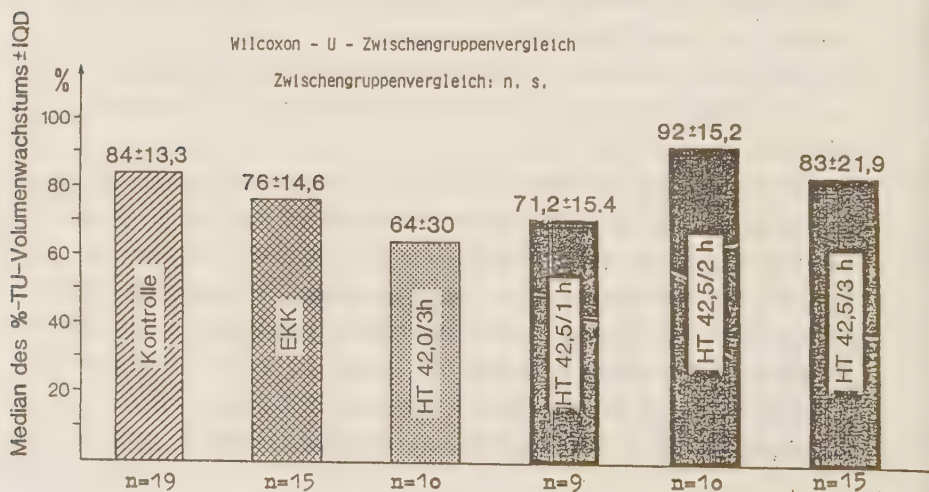


Abb. 4

TU-Volumenwachstumsgeschwindigkeit 7.-12. Tag nach HT



TUMORVOLUMEN BEI EXTRAKORPORALEM KREISLAUF MIT HYPERTHERMIE
VON 42,5°C ÜBER 180 MINUTEN

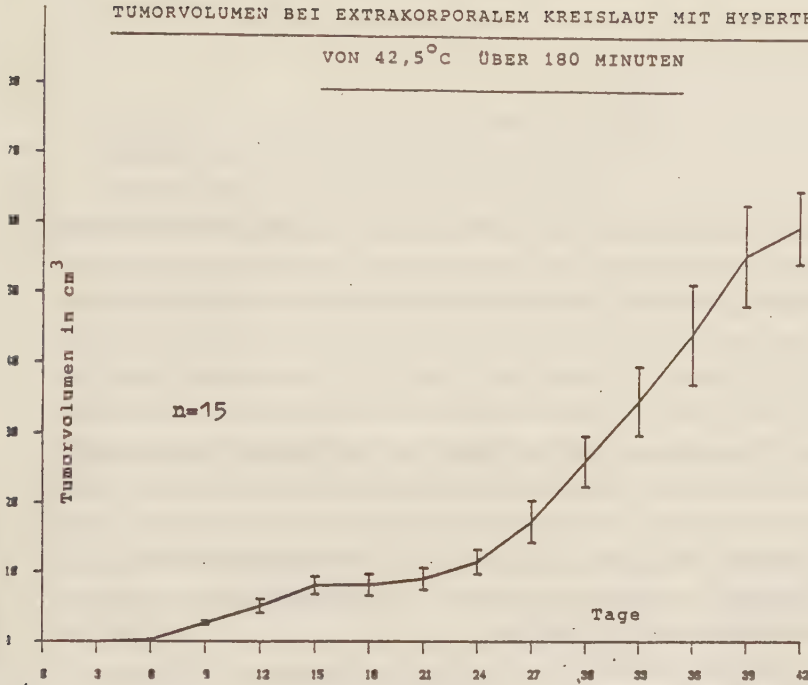


ABB. 5

SPONTANVERLAUF-KONTROLLGRUPPE

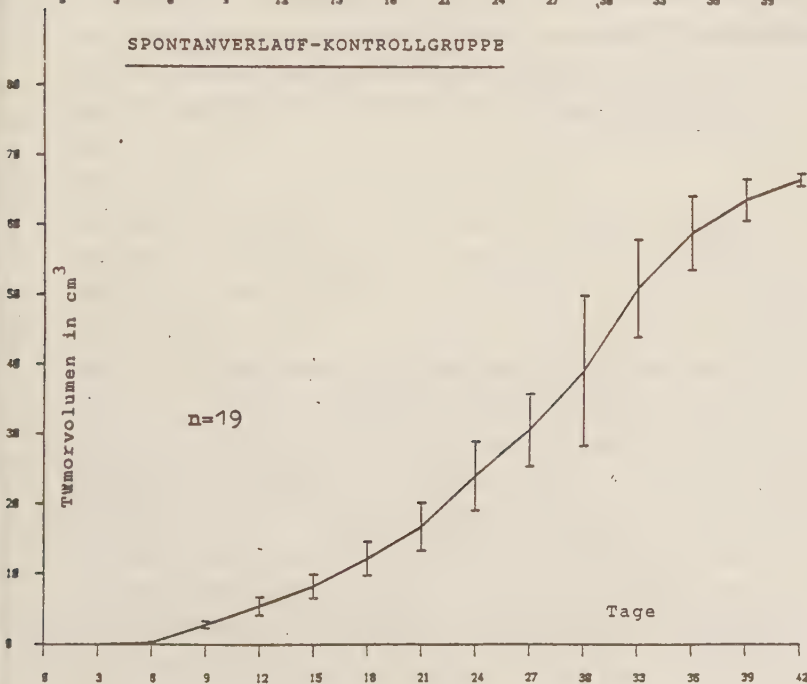


ABB. 6

4.8. PLANIMETRISCHE ERGEBNISSE

Die planimetrische Auswertung und Gegenüberstellung des Spontanverlaufs und der Gruppe 42,5°C über 180 Minuten ergibt bei der Untersuchung einen Tag nach Hyperthermie die am deutlichsten ausgeprägtesten Ergebnisse. Die Erhöhung des Nekroseanteils beträgt das Dreifache des Anteils beim Spontanverlauf.

12 Tage später beträgt diese Erhöhung nur noch etwas mehr als die Hälfte. Dies zeigt, in welchem Maße die Tumornekrose bei ungestörtem Wachstum des VX₂-Experimentaltumors zunimmt.

Da die Nekroseanteile nach der Hyperthermie in Tumorschnitte absolut gesehen fast gleich bleiben, ist diese Verschiebung des Verhältnisses in erster Linie auf die Nekrosezunahme in der Spontanverlaufsgruppe zurückzuführen.

Die Planimetrie bestätigt die histologisch und bei der Volumensmessung gefundenen Ergebnisse insofern, als daß auch hier eine Zunahme des Vitalgewebes einige Zeit nach der Hyperthermie eintritt.

4.9. ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE

In der Vergangenheit wurden wie früher bereits erwähnt, die verschiedensten Arten der Hyperthermie erprobt. Sie sind entweder onkologisch wenig effektiv oder mit zahlreichen Nebenwirkungen und Komplikationen behaftet.

Die im extrakorporalen Kreislauf induzierte systemische Hyperthermie vermittelt einen optimalen Wärmeaustausch zwischen Blut und Gewebe bzw. zwischen Blut und Tumor. Bei den über die Körperoberfläche erzeugten Hyperthermien sind längere Hyperthermiezeiten und höhere Temperaturen erforderlich, um die Kerntemperatur anzuheben. Dies bedingt wiederum eine Zunahme der behandlungsbedingten Nebenwirkungen wie Verbrennungen, Verbrühungen und Kreislaufkomplikationen.

Eine direkte Erwärmung des Blutes bedeutet kürzere Aufwärmphasen und rasche und exaktere Steuerbarkeit bei einer Minderbelastung des Patienten. Die Wärmeverteilung ist nahezu homogen und unabhängig von Gewebe, Art und Dichte. Es ist eine kontinuierliche Temperaturkontrolle wie sie bei keinem anderen Verfahren gegeben ist, möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß das angestrebte Ziel eine Tumorschädigung mittels Ganzkörperhyperthermie, die durch Erwärmung des Blutes im extrakorporalen Kreislauf induziert wird, erreicht werden kann.

Eine länger anhaltende Schädigung des von uns verwandten VX₂-Experimentaltumors kann nur in der 180-minütigen Hyperthermiegruppe bei 42,5°C erzielt werden, wobei diese Gruppe auch die tolerable Temperaturgrenze beim Kaninchen aufzeigt.

Die schon früher vor allem von der Arbeitsgruppe Dickson, Muckle und Shak erhaltenen Ergebnisse am gleichen Modell, aber mit anderen Hyperthermieverfahren (17,18,56,57,58,59,75) können bestätigt werden. Es können Hinweise für die schon früher angenommene Stase in Blutgefäßen von Tumoren nach der Anwendung extremer Hyperther-

mie (3,4,5,8,18) gewonnen werden, deren Folge eine Anhäufung von Stoffwechselschlacken ist, die das die Tumorzellen umgebende Milieu übersäuern und dadurch die durch Hyperthermie bewirkte Tumorschädigung verstärken (3,5,63).

Es erwies sich, daß eine partielle Schädigung des Tumorgewebes, bei der nur noch wenige Prozent vitaler Geschwulstzellen überleben, nicht ausreicht, um den VX₂-Experimentaltumor zu zerstören, sondern nur zu einer zeitweiligen Stagnation des Tumorstadiums führt.

Dieses Phänomen erreichen Lange et al. (46) bei gleichem Behandlungsschema auch am Menschen. Sie haben mittlere Überlebenszeiten von 10 Monaten bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Adenokarzinom, während unbehandelte Patienten durchschnittlich nur noch 4,7 Monate leben.

Das hier vorgestellte Tiermodell, das in Bezug auf die Art der Wärmezuführung neu ist, bietet wegen seiner Steuerbarkeit und Reproduzierbarkeit Ansätze für Krebstherapieforschungen auf dem Gebiet der Hyperthermie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die alleinige Anwendung einer im extrakorporalen Kreislauf induzierten Ganzkörperhyperthermie beim VX_2 -Experimentaltumor des Kaninchens eine objektivierbare und reproduzierbare tumorzerstörende Wirkung erreicht werden kann. Es wird die chirurgisch-technische Methode für die Versuchsdurchführung entwickelt. In den Hauptversuchen wird an 49 Tieren eine Hyperthermie mit Temperaturen von $42-43^{\circ}\text{C}$ über Zeiträume von 60-180 Minuten durchgeführt, an 15 Tieren werden die Auswirkungen eines alleinigen Anschlusses an den extrakorporalen Kreislauf sowie an 19 Tieren der Spontanverlauf untersucht. Die Beurteilungsparameter, die dieser Arbeit zugrundeliegen, sind die makro- und mikromorphologischen Untersuchungen von Tumoren und Organen des tumortragenden Kaninchens, das Tumolvolumen sowie die Planimetrie von Tumorschnitten.

2. Ergebnisse

Es kann nachgewiesen werden, daß eine extrakorporal induzierte Ganzkörperhyperthermie von $42,5^{\circ}\text{C}$ über 180 Minuten beim VX_2 -Experimentaltumor am Kaninchenmodell möglich ist und eine objektivierbare und reproduzierbare Tumorschädigung bewirkt.

Hyperthermien von $42,5^{\circ}\text{C}$ über 180 Minuten stellen die Überlebensgrenze der Tiere dar und bilden damit auch die Obergrenze der Tumorschädigungsleistung von 97 % Nekroseanteilen am Tumorgewebe. Es verbleibt ein vitaler Randsaum von Tumorzellen, der zum Ausgangspunkt neuen Krebswachstums werden kann.

Insgesamt stellt das Tiermodell wegen seiner raschen Generationsfolge, der Möglichkeit der guten Temperatursteuerung und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eine brauchbare Basis für die Tumortherapieforschung dar.

6. SUMMARY

The model of experimental extracorporeal induced whole-body-hyperthermia in the tumorbearing rabbit.

- morphological studies -

1. Methods

A technique has been developed to achieve objective and reproducible tumor alterations by an extracorporeal induced whole-body-hyperthermia on the VX₂-experimental tumor in rabbits.

The surgical technique as well as the technique for the extracorporeal circulation system has been developed.

49 rabbits were treated with hyperthermia of 42-43°C with a time range of 60-180 minutes. 15 animals were treated without hyperthermia only by connection to the extracorporeal circulation system and 19 spontaneous cases have been investigated in the main experiments.

In this work the macro- and micromorphological effects on the VX₂-tumor and the animals organs, the planimetric findings of tumor slices and the tumor volume have been examined.

2. Results

It could be proved that an extracorporeal induced whole body hyperthermia of 42,5°C for 180 minutes is a well possible in the rabbit as it produces an objective and reproducible tumor alteration on the specific rabbit VX₂-tumor.

Hyperthermia of 42,5°C for 180 minutes is the limit regarding the survival rate of the animals and the tumor alteration of 97 % tumor necrosis. A small edge zone of vital tumor cells remains and can be the onset of further tumor growth.

As a whole the animal model is because of the rapid alteration of generation as well as the possibility of good temperature control and reproducibility of the results a useful basis for investigations in tumor therapy.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HT	Hyperthermie
EKK	extrakorporaler Kreislauf
TU	Tumor
KGW	Körpergewicht
IQD	interquartile Distance
h	Stunde
min	Minute
i.m.	intramuskulär
mg	milligramm
ml	milliliter
Tab	Tabelle
NaHCO ₃	Bikarbonat

8. LITERATUR

1. Aigner, K., Schwemmler, K.: Technik der isolierten Extremitätenperfusion. Langenbecks Arch. Chirurg. 359, 113-122 (1983)
2. Angerer, R.:
Med. Diss. in Vorbereitung, TU München
3. Ardenne, M. von: Theoretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritttherapie. 2. Aufl. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1970/71)
4. Ardenne, M. von, Lippmann, H.G., Reitnauer, P.G., Justus, J.: Histological proof for selective step of microcirculation in tumor tissue at pH 6.2 and 41°C. Naturwissenschaften 66, 59-68 (1979)
5. Ardenne, M. von, Reitnauer, P.G.: Die manipulierte selektive Hemmung der Mikrozirkulation im Krebsgewebe. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 103, 269-279 (1982)
6. Bender, E., Schramm, T.: Untersuchungen zur Thermosensibilität von Tumor und Normalzellen in vitro. Acta Biol. Med. Germ. 17, 527-543 (1966)
7. Berghoff, F.: Zur Beeinflussung chronischer Krankheiten durch interkurrentes Fieber - Historische Bemerkungen. Klin. Wschr. 10, 2138 (1931)
8. Bicher, H.S. et al.: Effects of hyperthermia on normal and tumor microenvironment. Radiology 137, 523-530 (1980)
9. Bruns, P.: Die Heilwirkung der Ervsipels auf Geschwulste. Beitr. Klin. Chir. 3, 443-466 (1887)
10. Bull, J.M., Leeds, D., Schuette, W.: Whole body hyperthermia: a phase I trial of a potential adjuvant to chemotherapy. Ann. Intern. Med. 90, 317-323 (1979)
11. Burck, H.C.: Histologische Technik. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969)
12. Busch, W.: Über den Einfluß welchen heftigere Ervsipeln zuweilen auf organisierte Neubildungen ausüben. Verhandl. Naturin. Preuss. Rhein. Westphal. 23, 28-30 (1866)

13. Cavaliere, R., Ciocatto, E.C., Giovannella, B.C., Heidelberg, C., Johnson, R.O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, G., Rossi-Fanelli, A.: Selective heat sensitivity of cancer cells. *Biochemical and Clinical Studies. Cancer* 20, 1351-1381 (1967)
14. Coley, W.B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas - with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105, 487-511 (1893)
15. Crile, G., jr.: Heat as an adjunct to the treatment of cancer - experimental studies. *Cleveland Clin. Quart.* 28, 75-89 (1961)
16. Dahme, F., Weiss, E.: *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, (1983)
17. Dickson, J.A., Muckle, D.S.: Total body hyperthermia versus primary tumor hyperthermia in the treatment of the rabbit VX₂-carcinoma. *Canc. Res.* 32, 1916-1923 (1972)
18. Dickson, J.A.: The effect of hyperthermia in animal tumor systems. *Rec. Res. Cancer Res.* 59, 43-50 (1977)
19. Droste, F.J.:
Vet. Med. Diss. in Vorbereitung, München
20. Ehrlich, P.: Experimentelle Studien an Mäusetumoren. *Z. Krebsforsch.* 5, 59-81 (1907)
21. Enneking, W.F., Fynn, L.: Effects of VX₂-carcinoma implanted in bone of rabbits. *Canc. Res.* 28, 1007-1013 (1968)
22. Erhardt, W.: Anästhesieverfahren beim Kaninchen. *Tierärztl. Praxis* 12, 391-401 (1984)
23. Fowler, G.A.: Effects of acute concurrent infection on cancer in man (series A) - Pyrogenic infection in unoperable cancer, 152 cases. Unpublished report.
24. Frei, W.: *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin.* Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg (1972)

25. Fuhrman, F.A., Field, J.: Factors determining the metabolic rate of excised liver tissue. I. Effect of slice thickness and tissue injury on oxygen consumption. Arch. Biochem. 6, 337-349 (1945)
26. Gee, A.P., Williams, A.E., Pettigrew, R.T., Smith, A.N.: The effect of whole body hyperthermia therapy on the general immunocompetence in the advanced cancer patient. Int. Symp. on Treatment of Cancer by Hyperthermia and Radiation. Essen, Germany, Abstracts, Urban & Schwarzenberg, München (1977)
27. Geisel, O.: Anleitung zur Sektion von Haussäugetieren. Institut für Tierpathologie der Universität München, München (1976)
28. Giovanella, B.C.: Selective lethal effect of supranormal temperatures on mouse sarcoma cells. Canc. Res. 33, 2568-2578 (1973)
29. Goetze, O.: Örtliche Überwärmung gesunder und kranker Gliedmaßen. Dtsch. Z. Chir. 234, 577-582 (1932)
30. Gottschalk, S.: Zur Behandlung des ulcerierenden inoperablen Cervixcarcinoms. Zbl. Gynäk. 79, 80-83 (1899)
31. Grossman, S.A., Larson, B.S., Anderson, G.H., Hilton, G., White, C.L.: A new experimental model for neur-oncology research using the rabbit VX₂ carcinoma. Proc. Ann. Assoc. Canc. Res. 23, 872, meeting abstract (1982)
32. Haaland, M.: Contributions to the study of the development of sarcomas under experimental conditions. Imp. cancer Res. Fund Rep. 175-261 (1908)
33. Haam, E. von, Frost, T.T.: Changes in the parenchymatous organs produced by artificially induced fever. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42, 99-103 (1939)
34. Harisiadis, L.: Hyperthermia: Biological studies at the cellular level. Radiol. 117, 447-452 (1975)
35. Henderson, M.A., Pettigrew, R.T.: Induction of controlled hyperthermia in treatment of cancer. Lancet 1, 1275-1279 (1971)

36. Herman, T.S., Zukoski, C.F., Anderson, R.M., Hutter, G.G., Blitt, L.D., Malone, J.M., Larson, D.F., Dean, J.C., Roth, H.B.: Whole-body hyperthermia and chemotherapy for treatment of patients with advanced refractory malignancies. *Cancer Treat. Rep.* 66, 259-265 (1982)
37. Jensen, C.O.: Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen. *Zentralblatt Bakteriologie* 34, 28-122 (1903)
38. Johannes, W.: Die isolierte Extremitätenperfusion mit Cis-Platin am VX₂-Tumor des Kaninchens. *Vet. med. Diss.*, Gießen (1984)
39. Johnson, H.J.: The action of short radio waves on tissues. III. A comparison of the thermal sensitivities of transplantable tumours in vivo and in vitro. *Amer. J. Cancer* 38, 533-538 (1940)
40. Kellaway, C.H., Rawlinson, W.A.: Studies on tissue injury by heat. III. Isolated limb preparations. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22, 83-98 (1944)
41. Kenneth, R.: Comparison of some response to hyperthermia by normal human diploid cells and neoplastic cells from the same origin. *Eur. J. Cancer* 12, 481-491 (1976)
42. Kidd, F.G., Rous, P.: A transplantable rabbit-carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J. Exp. Med.* 71, 813-838 (1940)
43. Kirsch, R., Schmidt, D.: Erste experimentelle und klinische Erfahrungen mit der Ganzkörper Extrem-Hyperthermie. Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie. W. Duerr, F. Linder G. Wagner, Eds., Heidelberg, Springer-Verlag, pp 53-70 (1966)
44. Lambert, R.A.: Demonstration of the greater sensitivity of heat of sarcoma cells as compared with actively proliferating connective tissue cells. *J.A.M.A.* 39, 2147-2148 (1912)
45. Lampert, H.O.: Körper eigene Abwehr und bösartige Geschwulste. *Hang-Ulm* (1947)

46. Lange, J., Zänker, K.S., Siewert, J.R., Eisler, K., Kolb, E., Blümel, G., Remy, W.: Extrakorporal induzierte Ganzkörperhyperthermie bei konventionell inkurablen Malignompatienten. Dtsch. Med. Wschr. 108, 504-509 (1983)
47. Lange, J., Angerer, R., Zänker, K.S., Siewert, J.R., Blümel, G.: Wirkung der Ganzkörperhyperthermie auf den VX₂-Tumor des Kaninchens. Kongreßbericht der 25. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgie, Graz, 100-101 (1984)
48. Larkin, J.M., Edward, W.S., Smith, D.E.: Systemic thermotherapy: description of a method and physiologic tolerance in clinical subjects. Cancer 40, 3155-3159 (1977)
49. Loeb, L.: Über Transplantation von Tumoren. Virchow's Arch. Path. Anat. 172, 345-368 (1903)
50. Marmor, J.B., Hahn, G.M.: Ultrasound heating in previously irradiated sites. Int. J. Med. Oncol. Biol. Phys. 4, 1029-1032 (1978)
51. Mashima, Y., Nagatsu, M., Lambert, A.: Combination chemotherapy in isolation perfusion: use of mitotic inhibitors in pretreatment of VX₂-carcinoma undergoing isolation perfusion with alkylating agents. Canc. Chemoth. Rep. 56, 175-181 (1972)
52. Mendecki, J. et al.: Microwave-induced hyperthermia in cancer treatment apparatus and preliminary results. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 4, 1095-1103 (1978)
53. Merck Veterinary Manual
Fifth Edition 1979
Merck & Co., Inc. Rahway, N.Y. USA (1979)
54. Miller, T.R., Nicholson, J.T.: End results in reticulum cell sarcomas of bone treated by bacterial toxin therapy alone or combined with surgery and/or radiotherapy or with concurrent infection. Cancer Philadelphia 27, 524 (1971)
55. Mori, S., Clarkson, B., Masle, E.T., Laurence, W.: An experimental perfusion system using the rabbit VX₂-carcinoma. Surg. Res. 2, 268-272 (1962)

56. Muckle, D.S., Dickson, J.A., Johnston, I.D.A.: The effect of temperature on metabolic activity and growth rate of the VX₂-carcinoma in rabbits. *Brit.J. Surg.* 57, 863-864 (1970)
57. Muckle, D.S., Dickson, J.A.: The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth rate of malignant cells. *Br. J. Cancer* 25, 771-777 (1971)
58. Muckle, D.S., Dickson, J.A., Johnston, J.D.: The adjuvant effect of hyperthermia on the response of the VX₂-carcinoma in rabbits to methotrexate or radiotherapy. *Brit. J. Surg.* 58, 869 (1972)
59. Muckle, D.S., Dickson, I.A.: Hyperthermia (42⁰C) as an adjuvant to radiotherapy in the treatment of the allogene VX₂-carcinoma in the rabbit. *Brit. J. Cancer* 27, 307-310, (1973)
60. Overgaard, K., Okkels, H.: The action of heat on Wood's sarcoma. *Acta Radial.* 21, 577-582 (1940)
61. Overgaard, K., Overgaard, J.: Investigations on the possibility of thermic tumour therapy. I. Shortwave treatment of a transplanted isologous mouse mammary carcinoma. *Europ. J. Cancer* 8, 65-70 (1972)
62. Overgaard, J.: Influence of extracellular pH on the viability and morphology of tumour cell growth. *Cancer Res.* 56, 1243-1247 (1980)
63. Palzer, R.G., Heidelberger, C.: Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing. *Canc. Res.* 33, 415-421 (1973)
64. Percy, J.F.: Heat in the treatment of carcinomas of the uterus. *Surg. Gynec. Obstet.* 22, 77-79 (1916)
65. Pettigrew, R.T., Galt, J.M., Ludgate, C.M.: Clinical effects of whole-body hyperthermia in advanced malignancie. *Br. J. Med.* 469-682 (1974)
66. Pettigrew, R.T., Lugate, C.M.: Whole body hyperthermia, a systemic treatment for dissiminated cancer. *Br. J. Surg.* 61, 727-730 (1974)

67. Pschyrembel, W.: Klinisches Wörterbuch. Verlag Walter de Gruyter, Berlin-New York, 254. Auflage, (1982)
68. Rohdenburg, G.L.: Fluctuations in the growth of malignant tumors in man with special reference to spontaneous recession. J. Cancer Res. 3, 193-225 (1918)
69. Rohdenburg, G.L., Prime, F.: Effect of combined radiation and heat on neoplasms. Arch. Surg. 2, 116-129 (1921)
70. Romeis, B.: Mikroskopische Technik. 16. Aufl. R. Oldenbourg Verlag, München-Wien (1968)
71. Sachs, L.: Angewandte Statistik. 5. Aufl., Verlag Springer Berlin-Heidelberg (1978)
72. Sandersleben, J. von., Dämmrich, K., Dähme, E.: Pathologische Histologie der Haustiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1981)
73. Selawry, O.S., Goldstein, M.N., McCormick, T.: Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin. Cancer Res. 17, 785-791 (1957)
74. Selawry, O.S., Carlson, J.C., Moore, G.E.: Tumor response to ionizing rays and elevated temperatures: A review and discussion. Amer. J. Roentgenol. 80, 33-38 (1958)
75. Seybarth, H.W.: Prostaglandin mediated hypercalcemia - a paraneoplastic syndrome. Klin. Wschr. 56, 373-387 (1978)
76. Shah, S.A., Dickson, J.A.: Effect of hyperthermia on the immunocompetence of VX₂-tumour bearing rabbits. Canc. Res. 38, 3523-3531 (1979)
77. Shear, M.J., Perrault, A.: Chemical treatment of tumours - IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injections of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. J. Nat. Cancer Inst. 4, 461-476 (1944)
78. Shope, R.E.: Infectious papillomatosis of rabbits. J. Exp. Med. 58, 607-612 (1933)
79. Suzuki, K.: Application of heat to cancer chemotherapy. Nagoya J. Med. Sci. 30, 11-19 (1967)

80. Schulman, N. et al.: Hyperthermia: It's effect on proliferative and plateau phase cell cultures. *Radiology* 113, 207-209 (1974)
81. Stehlin, J.S., Jr.: Hyperthermic perfusion with chemotherapy for cancer of the extremities. *Surg. Gynec. Obstet.* 129, 305-310 (1969)
82. Stewart, H.L., Snell, K.C. et al.: Transplantable and transplantable tumors of animals. *Atlas of Tumor Pathology Sect. XIII, Fasc. 40*, Washington DC. Armed Forces Inst. of Pathol. (1959)
83. Thompson, S.W.: Selected histochemical and histopathological methods. C.C. Thomas Publisher Springfield, Illinois, USA (1966)
84. Ungar-Waron, H., Gluckman, A., Spira, E., Waron, M., Trainin, Z.: Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX₂-carcinoma. *Canc. Res.* 38, 1296-1299 (1978)
85. Vermel, E.M., Kuznetsova, L.B.: Hyperthermia in the treatment of malignant diseases. *Probl. Oncol.* 16, 96-100 (1970)
86. Vidal, W.: *Travaux de la Deuxieme Conference Internationale pour l'etude du cancer*, Paris, 160 (1911)
87. Voelkel, E.G., Tashjian, A.H., Levine, L., Alper, G.A.: Hypercalcemia and tumor prostaglandins - The VX₂ carcinoma model in the rabbit. *Metabolism* 24, 973-986 (1975)
88. Voelkel, E.F., Levine, L. et al.: Acute phase reactants ceruloplasmin and haptoglobin and their relationship to plasma prostaglandins in rabbits bearing the VX₂ carcinoma. *J. Exp. Med.* 147, 1078-1088 (1978)
89. Vollmar, H.: Über den Einfluß der Temperatur auf normales Gewebe und Tumorgewebe. *Z. Krebsforsch.* 51, 71-99 (1941)
90. Walcher, S:
Med. Diss. in Vorbereitung, TU München

91. Warren, S.L.: Preliminary study of the effect of artificial fever upon hopeless tumor cases. Amer. J. Roentgenol. 33, 75-81 (1935)
92. Weisbroth, S.H., Flatt, R.E., Uraus, A.L.: The biological of the laboratory rabbit. Academic Press New York (1974)
93. Westermarck, F.: Über die Behandlung des Ulcerinended Cervixcarcinoms. Mittel konstanter Wärme. Zbl. Gynak. 1335-1339 (1898)
94. Westermarck, H.: The effect of heat upon rat tumours. Scand. Arch. Physiol. 52, 257-322 (1927)
95. Wolfe, H.J., Bitman, W.R.: Systemic effects of the VX₂-carcinoma on the osseous skeleton. Lab. Invest. 38, 208-215 (1978)
96. Young, D.M., Ward, J.H., Prieur, D.J.: Hypercalcemia of malignency - animal model of human disease. Am. J. Pathol. 93, 620-622 (1978)
97. Young, S.W., Hollenberg, N.K., Abrams, H.L.: The influence of implantation site on tumor growth and blood flow. Europ. J. Canc. 15, 771-777 (1979)

L E B E N S L A U F

22.11.53	geboren in Papenburg/Ems Lkrs. Emsland als Sohn des Hoteliers Willy Hilling und seiner Frau Gerda Hilling geb. Mayworm
Ostern 1960	Einschulung in die Volksschule Papenburg
Ostern 1964	Wechsel zum Gymnasium Papenburg
16.05.73	Abitur am Gymnasium Papenburg
18.10.73	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen in den Fächern Volkswirtschaft, Publizistik und Soziologie
1.12.74- 31.03.76	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Debestedt sowie in den Universitätskliniken Göttingen
1976/77	Freiwilliges Praktikum in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
1977	Ausbildung als Besamungstechniker
1.11.77	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilian-Universität München im Fach Tiermedizin
8.12.82	Aprobation als Tierarzt
ab 15.11.82	Doktorarbeit im Krankenhaus Rechts der Isar, München
15.02.83- 15.01.85	Assistent bei Dr. Stöhr - Pfaffenhofen
ab 15.01.85	Tätigkeit als Praxisvertreter

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. J. von Sandersleben, Leiter des Instituts für Tierpathologie der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich für die Übernahme dieser Arbeit in die Tierärztliche Fakultät und für seine wohlwollende Anteilnahme danken.

Herrn Prof. Dr. med. G. Blümel, Leiter des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Labormittel sowie für seine freundliche und verständnisvolle Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für seine immer freundliche und hilfreiche Unterstützung und Geduld bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. med. habil. J. Lange gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung und Hilfestellung bei der Organisation der Versuche sowie für die Bereitstellung der Mittel, die diese Arbeit erst ermöglichten.

Den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München möchte ich für die freundlichen Zusammenarbeit und Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche danken, Frau R. Zündorf und Frau H. Schühle für ihre Anleitung zur histologischen Technik.

Frau Dr. med. vet. K. Geißdörfer aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie und Herrn Dr. med. Schiessl aus dem Institut für Pathologie im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München, danke ich für Ihre Hilfe bei der Befundung der histologischen Schnitte.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. vet. Fender aus dem Institut für Anatomie und Histologie der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München für die Überlassung von histologischen Vergleichspräparaten danken.

Außerdem danke ich dem Krebsforschungszentrum Heidelberg für die Bereitstellung des Tumormaterials sowie für Literaturhinweise, insbesondere Herrn Dr. med. Loerke für seine freundliche Unterstützung.

Schließlich möchte ich Herrn R. Angerer, Herrn S. Walcher und Herrn F.J. Droste für ihre stets freundliche, hilfreiche und tolerante Mitarbeit an den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen herzlich danken.

